



Etude des mécanismes dépendants de GBF1 et impliqués dans la réplication du virus de l'hépatite C

Rayan Farhat

► To cite this version:

Rayan Farhat. Etude des mécanismes dépendants de GBF1 et impliqués dans la réplication du virus de l'hépatite C. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S040 . tel-01166048

HAL Id: tel-01166048

<https://theses.hal.science/tel-01166048>

Submitted on 22 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ LILLE II

École Doctorale Biologie Santé de Lille

Pour l'obtention du grâde de
Docteur de L'UNIVERSITÉ LILLE II

Étude des mécanismes dépendants de GBF1 et impliqués dans la réplication du virus de l'hépatite C

Présentée et soutenue publiquement par :

Rayan FARHAT

Le 5 novembre 2014

Devant le jury composé de :

M. Didier HOBER
Mme Annette MARTIN
M. Philippe ROINGEARD
Mme Catherine JACKSON
M. Yves ROUILLÉ

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ LILLE II

École Doctorale Biologie Santé de Lille

Pour l'obtention du grâde de
Docteur de L'UNIVERSITÉ LILLE II

Étude des mécanismes dépendants de GBF1 et impliqués dans la réplication du virus de l'hépatite C

Présentée et soutenue publiquement par :

Rayan FARHAT

Le 5 novembre 2014

Devant le jury composé de :

M. Didier HOBER
Mme Annette MARTIN
M. Philippe ROINGEARD
Mme Catherine JACKSON
M. Yves ROUILLÉ

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

Remerciements

Je pense que pendant la rédaction de ma thèse la partie la plus critique à écrire était la partie des remerciements puisqu'elle doit résumer des faits qui se sont déroulés sur un quart de siècle. J'aimerais bien m'excuser auprès des personnes que j'ai oublié de mentionner (je vais essayer de ne pas oublier)

Je vais commencer par remercier les membres du jury, Didier Hober, Philippe Roingeard, Annette Martin et Cathy Jackson, qui ont accepté de consacrer du temps pour évaluer mon travail.

Jean,

Merci pour ton accueil au labo pendant ses 4 ans, pour tes conseils... Tu es une personne qui possède des qualités exceptionnelles. Les discussions pendant ton café du midi étaient assez diversifiées... Elles commençaient bien évidemment par la science passaient par un peu de politique, d'actualités et finissaient bien évidemment dans ton domaine préféré : L'ÉCOLOGIE

Yves,

Mon directeur de thèse très discret, très humain qui a suivi de près mon année de master 2 et les 3 ans de thèse qui ont suivi. Tes qualités scientifiques exceptionnelles qui m'ont appris qu'une solution est toujours là pour répondre à nos questions ou problèmes. J'ai appris que je devais essayer toute manipe qui semble intéressante et bien évidemment ne pas oublier les

contrôles. Toujours accueillant dans ton bureau, la discussion scientifique pouvait démarrer à n'importe quel moment. Les heures au confocal étaient bien productives avec des discussions politiques bien fructueuses. Quand tu manipulais à ta paillasse on entendait de temps en temps des moqueries qui peuvent viser un large spectre.

Sandrine,

Merci pour ton soutien et tes conseils scientifiques. Tu es toujours là pour aider tout le monde. Tes gâteaux ont toujours été aussi bon (d'ailleurs ça fait un moment qu'on en n'a pas eu...) Je n'oublierais jamais que tu m'as pas dispensé du ménage du P2.

Claire,

Tu es toujours là pour aider et se soucier avec les autres pour leurs problèmes scientifiques et perso. C'est vrai que je t'ai fait galérer pour que je respecte les règles d'hygiènes et sécurité.

Karín,

Ta participation à mon projet a permis d'avancer beaucoup plus rapidement. Les résultats étaient toujours super... On faisait une bonne équipe.

Nath,

L'organisation de ton calendrier qui n'a jamais oublié une date d'anniversaire (bien sur tu l'obligeais à faire un pot). Après la rentrée des vacances d'été tu commençais déjà à préparer le repas

de Noël. Sans toi les mange-tôt ne sont pas ponctuels. J'ai bien compris qu'avec toi faudra pas parler de l'âge (?0 ans)

Muriel,

Ton caractère discret, sympa participe à maintenir la bonne ambiance au Labo

André,

Grâce à toi j'ai toujours pu prévoir quel temps fera pendant mes soirées festives (malgré qu'il faisait pas souvent beau) Tes blagues sont indispensables pendant le repas ou autour du café

Csez,

Si un problème exotique survient à votre clonage faudra demander à Csez, il a sûrement du avoir une histoire semblable tout le long des années. Pendant ses 4 ans j'ai pu voir ton passage de l'opposition à être membre de la mairie et pourquoi pas maire les prochaines élections

Laurence,

Ta diplomatie cache un caractère rigide, très sympa et humain. Tu as toujours été là pour aider, donner des conseils et défendre les droits de l'étudiant. Ta capacité à détecter les traces de cannelle dans un plat ou même le cuisinier n'était sur de lui même. C'est d'ailleurs pourquoi le foie gras de Noël est toujours aussi excellent.

Soph,

Toujours là pour intervention rapide en cas de panne ou pour répondre à une question informatique. Avec toi j'ai appris à aimer Apple jusqu'au point où je me suis demandé si t'avais une commission par Apple. Merci pour ta participation à la construction des figures des articles. Les farces que tu faisais, le poisson d'avril ont toujours été très diversifiées

Laura,

J'ai pu entendre un accent belge venant d'une italienne. J'aimerais bien que tu puisse switcher au ch'ti à la fin de ton séjour à Lille. Avec Nana vous étiez capables de ne pas écouter nos blagues (avec soph) qui vous considérez lourdes.

Lucie,

Les congrès avec toi étaient spéciaux et bien sur grâce à toi j'ai fait le module transmission des connaissances scientifiques. Tu me faisais toujours penser de la date pour aller au musée des sciences.

Adeline,

Ma voisine de paillasse qui m'a supporté à chaque fois que je débordais. Merci de m'avoir laissé ta paillasse les mercredis et d'avoir veillé aux lavages quand j'allais manger (l'inverse était vrai aussi). Je reviens à la paillasse après l'écriture donc faudra me supporter à nouveau.

Marie-Emmanuelle,

A toi la relève... la thèse est une super aventure... profite de chaque moment

A tous les autres HCV, que j'ai croisé pendant le séjour au Labo. Je ne citerais pas la liste est grande. Merci pour vos soutiens...

Ioan,

Merci pour les discussions scientifiques qui démarraient toujours autour d'un verre et qui se terminaient aux moments de fermeture du café

Julie et Flo mes amis (du 62),

Les apéros étaient toujours assez sympas, malgré que ces derniers temps nous n'avons pas trop eu le temps ! Je sais que je vous toujours promis de vous rendre visite boulbeach mais il a fallu un petit moment pour que je puisse m'accomoder à l'idée...

A mes mes ex-colloques, collègues de promo avec qui nous avons partagé 1 année de master et qui se trouvent maintenant aussi en phase finale de leur thèse. Les pauses café étaient super !

A mes amis et collègues de la vie nocturne... Merci de m'avoir soutenu... Les soirées étaient toujours assez géniales sauf que je ne pouvais pas vous suivre tout les soirs (je devais être frais au labo le lendemain)

A mes amis libanais que j'ai laissés en 2009 et que je n'ai pas trop eu le temps de vous rendre visite assez souvent.

Nico,

Merci pour le soutien que tu m'as apporté ! ça faisait plaisir d'avoir un « frère » sur Lille

Merci à ma famille en France Les Reda et Les Bossi : Les appels de soutiens ainsi que les rencontres pendant les vacances et surtout au Liban. Je n'ai pas trop eu le temps de venir vous voir ces derniers temps.

Rudy, Rima et Sarmad,

Nous avons grandi ensemble ! Merci pour tout. Les moments de notre enfance inoubliables même quand on se chamaillait... J'espère que vous serez là pour ma soutenance

Mes parents : Majed et Lina

Les mots sont trop difficiles pour remercier tout ce que vous avez fait pour moi. Si aujourd'hui je suis ici c'est GRACE A VOUS. J'espère que j'ai été au niveau de la responsabilité que vous m'avez accordé

Résumé

L'infection par le virus de l'hépatite C (HCV) évolue dans la plupart des cas en hépatite chronique et peut conduire à une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire. Malgré les grandes avancées dans le traitement de l'hépatite C qui permettent d'inhiber ou même de bloquer l'évolution de cette infection vers la chronicité, l'absence de vaccin ainsi que sa répartition sur la surface du globe nous permet de classer cette pathologie en problème majeur de santé publique. La majorité des traitements actuels ciblent les protéines virales et leur fonction. Cependant un grand nombre de mécanismes du cycle viral de HCV reste à élucider.

Comme pour la grande majorité des virus à ARN de polarité positive, la réplication de HCV a lieu dans des membranes cellulaires modifiées. Le remaniement de ces membranes est en lien étroit avec la voie de sécrétion précoce de la cellule. Il a été montré que GBF1, un facteur d'échange nucléotidique des protéines G de la famille Arf qui régulent la dynamique membranaire, est un facteur nécessaire à la réplication de HCV. L'inhibition de GBF1 par la bréfeldine A (BFA) inhibe la voie de sécrétion des protéines cellulaires néosynthétisées et inhibe aussi la réplication de HCV. Pour étudier le rôle de GBF1 pendant l'infection nous avons établi des lignées résistantes à la BFA. Deux de ces lignées étaient 100 fois plus résistantes que les lignées parentales à l'apoptose induite par la BFA, à l'inhibition de la sécrétion des protéines et à l'inhibition de l'infection par HCV. Ce phénotype était dû à une mutation ponctuelle dans le domaine catalytique *sec7* de GBF1 de ces lignées. Un autre groupe de lignées était partiellement résistantes à l'inhibition de la sécrétion des protéines par la BFA tout en conservant un niveau d'infection proche de celui des lignées parentales dans les mêmes conditions. Ces résultats suggèrent que la fonction de GBF1 pendant l'infection HCV ne serait pas réduite à la régulation de la voie de sécrétion, évoquant ainsi un rôle additionnel de GBF1 nécessaire pour la réplication de HCV.

Par ailleurs, nous avons pu montrer à l'aide des mutants de délétion de la protéine GBF1, que l'activité catalytique du domaine *sec7* était nécessaire. Ceci suggère l'implication d'une protéine de la famille Arf dans l'activation de l'infection HCV via GBF1. L'implication de Arf dans l'infection HCV a été confirmée par la surexpression de dominants négatifs de la protéine Arf1 et par l'inhibition de l'activité de l'ArfGAP1 (régulateur des Arf) par l'inhibiteur spécifique QS11. Cette diminution de l'infection HCV

est d'environ 85% avec les dominants négatifs de Arf1. Par ailleurs QS11 inhibe la réplication de HCV d'une manière dose dépendante.

Nous avons ensuite testé l'implication des différents Arf sensibles à l'inhibition par la BFA (Arf1, 3 ,4 et 5), dans l'infection HCV à l'aide de si-RNA. Il a été montré que ces protéines Arf possèdent des fonctions redondantes. Nos résultats confirment l'implication de Arf1 et indiquent que les 3 autres protéines sont aussi impliquées dans l'infection HCV. D'une manière intéressante, la déplétion combinée des Arf inhibe fortement l'infection HCV suggérant ainsi un rôle essentiel de certaines protéines Arf, probablement en activant des facteurs cellulaires nécessaires à l'étape de réplication.

L'étude des facteurs cellulaires impliqués dans l'infection HCV permet de mieux comprendre l'étape de réplication et par conséquent le cycle viral de HCV. Par ailleurs, l'étude de ces facteurs pourrait permettre le développement éventuel de stratégies antivirales ciblant des facteurs de la cellule hépatique indépendamment du génotype viral, limitant ainsi le risque d'émergence de variants résistants au traitement.

Abstract

The hepatitis C virus (HCV) infection progresses in most of the cases into a chronic hepatitis and can lead to cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Despite the recent improvement of hepatitis C treatments, which inhibit or even block the progress of this infection into a chronic stage, a vaccine still not available and the worldwide distribution of the disease makes the hepatitis C a major public health problem. Most of the available treatments target viral proteins. However many mechanisms of the HCV life cycle remain unclear.

As for many positive RNA viruses, HCV replication occurs in reorganized cellular membranes. These membrane rearrangements are closely linked to the early secretory pathway of the cell. It has been shown that GBF1, an exchange factor of small G proteins of the Arf family that regulates the membrane dynamics in the secretory pathway, is required for HCV replication. GBF1 inhibition by brefeldin A (BFA) inhibits the secretion of newly synthesized proteins and also inhibits HCV replication. To investigate the role of GBF1 in HCV infection, we isolated cell lines resistant to BFA. Two of these cell lines were 100 times more resistant than the parental cells to BFA-induced apoptosis, inhibition of proteins secretion and inhibition of HCV infection. This resistance was due to a point mutation in the catalytic *sec7* domain of GBF1 of these cells. Another group of resistant cells was showing a partial resistance to the inhibition of proteins secretion while maintaining their sensitivity to the inhibition of HCV infection in the same conditions. These results suggest that GBF1 might fulfill another function, in addition to the regulation of the secretory pathway, during HCV replication.

Using GBF1 deletion mutants we showed that the catalytic activity of the *sec7* domain of GBF1 is required for HCV infection. This suggests that the function of GBF1 during HCV replication is mediated by Arf activation. The involvement of Arf was confirmed with the overexpression of restricted mutants of Arf1 and by the inhibition of ArfGAP1, another regulator of Arf function.

We then tested the possible involvement of different Arfs (Arf1, 3, 4 and 5) in HCV infection. It has been reported that Arfs have redundant functions. The results confirm the involvement of Arf1 and indicate that all the other BFA-sensitive Arfs (Arf3, Arf4 and Arf5) are also involved in HCV infection. The combined knockdown of Arfs strongly

inhibited HCV replication, showing that the Arf proteins are working together in HCV replication probably by activating several host factors required for the virus life cycle. The study of cellular factors required for HCV infection is crucial to better understand the interaction of the virus with the host cell and thus the whole HCV life cycle. This could help to develop new therapies targeting the host cell, regardless of viral genotypes and reducing the risk of emergence of new resistant forms.

Sommaire

A. L'hépatite C	19
1) Découverte du virus de l'hépatite C	19
2) Epidémiologie	19
3) Modes de transmission	20
a) Contamination post-transfusionnelle	20
b) Transmission par voie intraveineuse	21
c) Transmission par voie nosocomiale	21
4) Evolution et étapes de la pathogenèse	21
a) L'hépatite aigüe C	22
i. Quantification de l'ARN viral de HCV	22
ii. Élévation des transaminases hépatiques et apparition des premiers signes cliniques	22
iii. Apparition des anticorps anti-HCV	23
b) L'hépatite chronique C	23
c) La cirrhose décompensée et le carcinome hépatocellulaire	24
5) Réponse immunitaire anti-HCV de l'hôte	24
a) La réponse immunitaire innée	24
b) La réponse immunitaire adaptative	25
i) La réponse adaptative cellulaire	26
ii) La réponse adaptative humorale	28
6) Evolution de la thérapie de l'hépatite C	29
a) La bithérapie contre l'hépatite C	30
b) La trithérapie contre l'hépatite C	31
c) La révolution du traitement de l'hépatite C	31
d) Futures stratégies	32
e) Tentatives de vaccination	32
B. Le virus de l'hépatite C	34
1) Classification du virus de l'hépatite C	34
2) Propriétés de la particule virale de HCV	35
3) Organisation du génome de HCV	36
a) Les régions non-codantes du génome de HCV	37
i) La région 5' non-codante (5' NC)	37
ii) La région 3' non-codante (3' NC)	38
b) Les protéines structurales	38
i) La protéine de capsid C (core)	38

ii) La protéine F	39
iii) Les glycoprotéines d'enveloppe E1, E2	40
c) Les protéines non-structurales	42
i) La protéine p7	42
ii) La protéine NS2	43
iii) La protéine NS3 et son cofacteur NS4A	44
iv) La protéine NS4B	45
v) La protéine NS5A	46
vi) La protéine NS5B	47
4) Les modèles d'études de HCV	48
a) Les modèles cellulaires	49
i) La culture d'hépatocytes primaires provenant de patients infectés	49
ii) Les réplicons génomiques de HCV	49
iii) Les particules rétrovirales pseudotypées (HCVpp)	51
iv) Le premier système productif en culture cellulaire (HCVcc)	53
b) Les modèles animaux : les souris « humanisées »	56
5) Le cycle viral de HCV	57
a) Les facteurs d'attachement	59
i) Les lectines	59
ii) Les Glycosaminoglycanes (GAGs)	59
iii) Le récepteur des LDL (LDL-R)	60
b) Les facteurs d'entrée	60
i) La tétraspanine CD81	60
ii) La protéine SRBI	61
iii) La claudine 1	62
iv) L'occludine	63
v) La scramblase 1	63
vi) Les récepteurs tyrosine kinase (RTK)	63
vii) Le récepteur NPC1L1	64
c) L'internalisation et la fusion des LVP	64
d) La traduction de l'ARN HCV	65
e) La réplication de l'ARN viral	67
i) Régulation de la réplication	68
ii) Rôle des protéines virales	70
iii) Rôle des protéines cellulaires	70
iv) Structure et organisation du MW	73
f) Assemblage et sécrétion des particules	76
C. Remaniements membranaires et réplication de HCV	79
1) Le transport vésiculaire dans la cellule	79

2) Rôle de la superfamille Ras dans l'événement de transport	81
3) Les protéines G de la famille Arf	84
a) Echange nucléotidique par les GEF	87
b) Hydrolyse de la forme Arf-GTP	87
c) Inhibition de la régulation des Arf	89
i) La bréfeldine A (BFA)	90
ii) Le Golgicide A (GCA)	91
iii) QS11	92
4) La régulation de la voie de sécrétion par GBF1 et ArfGAP1	92
5) Inhibition de l'infection virale par la BFA	94
6) Facteurs cellulaires sensibles à la BFA et nécessaires à la réplication virale	95
Résultats	98
Article 1	104
Article 2	148
discussion	182
Bibliographie	187

Liste des abréviations

A

Alb-uPA Albumin-urokinase Plasminogen Activator
AP Adaptor protein
ApoB Apolipoprotéine B
ApoE Apolipoprotéine E
ARF ADP Ribosylation Factor
ARFP Alternative Reading Frame Protein
Arl ARF like protein
ATGL Adipose triglyceride lipase

B

BARS Brefeldin A-dependent ADP-Ribosylated Substrate
BFA Bréfeldine A
BIG1 Brefeldin A-inhibited Guanine exchange factor 1
BIG2 Brefeldin A-inhibited Guanine exchange factor 2

C

CERT Ceramide-transfer protein
CIDEB Cell death-Inducing DFFA-like Effector B
CLDN-1 Protéine Claudine 1
CMS Cellule Mononucléée du Sang
COPI Coatomer protein 1
CVB3 Coxsakievirus B3

D

DAG Diacylglycérol
DC-SIGN Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

E

EEA1 Early Endosome Antigen 1
eIF2 eukaryotic Initiation Factor 2
eIF3 eukaryotic Initiation Factor 3
EMCV Virus de l'encéphalomyocardite
EWI-2wint EWI-2 without its N-terminus

F

FKBP8 FK506-binding protein

G

GAP Facteur d'activité GTPasique
GBF1 Golgi-associated Brefeldin A-resistant Factor 1
GCA Golgicide A
GEF Facteur d'échange nucléotidique
GFLV Grapevine Fanleaf Virus
GFP Protéine verte fluorescente
GGA Golgi-localised Gamma-ear containing ARF binding protein

GL Gouttelette Lipidique

H

HDL Lipoprotéine de forte densité

Hsp90 Heat Shock Protein 90

HSA Human serum albumin

HSV Herpes Simplex Virus

HVR1 Hypervariable Region 1

I

IFN Interféron

IPS-1 Interferon Promoter Stimulator protein 1

IRES Site interne d'entrée des ribosomes

L

LDL Lipoprotéine de faible densité

LDL-R Récepteur des lipoprotéines de faible densité

LEL Large boucle extracellulaire

LPL Lipoprotéine lipase

LTR Long Terminal Repeat

L-SIGN Liver/lymph node-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

M

MAVS Mitochondrial Antiviral Signaling protein

MHV Virus de l'hépatite murine

MLV Virus de la leucémie murine

MTP Protéine microsomale de transfert

N

NK Natural Killer

NRK Normal Rat Kidney

O

ORF Cadre de lecture ouvert

OSBP Oxystérol binding protein

P

PBS Primer Binding Site

PEG Polyéthylène-Glycol

PH Pleckstrin Homology

PI4K Phosphatidylinositol 4-Kinase

PI4P Phosphatidylinositol 4-Phosphate

PIP5K Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase

PLD Phospholipase D

PPIase Peptidyl-Prolyl cis-trans-Isomérase

PPT Polypurine Tract

PTB Polypirimidine-Tract-Binding protein

PV Poliovirus

R

RE Reticulum Endoplasmique

RIG-I Retinoic acid-Inducible Gene-I

S

SAA Serum Amyloide A

SCID Severe Combined Immunodeficiency

SFV Virus de la forêt de Semliki

SM Sphingomyéline

SNARE Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor

SR-BI Scavenger Receptor type B class I

STAT-C Specifically Targeted Antiviral Therapy for HCV

T

TBC1D20 TBC1 domain family, member 20

TGN Trans-Golgi Network

Th T helper

TLR3 Toll-Like Receptor 3

TMD Domaine transmembranaire

TRIF Toll/IL-1 Receptor domain-containing adapter inducing interferon β

U

UPR Unfolded Protein Response

V

VAP-A Vesicle-Associated membrane protein-associated Protein-A

VAP-B Vesicle-Associated membrane protein-associated Protein-B

VISA Virus-Induced-Signaling Adapter

VLP Virus-Like Particle

VLDL Lipoprotéine de très faible densité

VSV Virus de la Stomatite Vésiculaire

W

3'NC 3' non-codante

5'NC 5' non-codante

A. L'hépatite C

1) Découverte du virus de l'hépatite C

Un certain nombre d'hépatites post-transfusionnelles diagnostiquées pendant les années 1970 n'étaient causées par aucun des deux virus hépatiques connus à l'époque, le virus de l'hépatite A (HAV) et le virus de l'hépatite B (HBV). Le pathogène responsable de ces hépatites nommées « non-A, non-B » resta inconnu jusqu'à ce qu'en 1989, le cDNA d'un virus fut isolé à partir du sang d'un patient atteint d'hépatite « non-A, non-B » et fut dénommé virus de l'hépatite C (HCV). Ce virus transmis essentiellement par voie parentérale est un virus enveloppé, son génome est constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive et fut classé dans la famille des *Flaviviridae* (Choo *et al.*, 1989).

Ce virus présente une sélectivité d'infection et ne peut ainsi infecter que les cellules hépatiques humaines ou celles du chimpanzé. Le virus de l'hépatite C est répandu de manière inégale à la surface du globe. L'infection par ce virus évolue dans un grand nombre de cas vers la chronicité, aggravant ainsi la situation. A ce fait, vient se rajouter l'absence de vaccin et le coût très élevé des traitements malgré les grandes avancées récentes. La contribution de ces facteurs a permis de classer cette pathologie comme problème majeur de santé publique.

2) Epidémiologie

Au moment de sa découverte en 1989, le virus de l'hépatite C était associé essentiellement aux personnes ayant subi une transfusion sanguine. De nos jours les personnes à risque sont les toxicomanes dans les pays développés. Au fur et à mesure, l'infection par le virus de l'hépatite C s'est montrée étendue sur toute la surface du globe d'une manière inégale. La difficulté du dépistage de cette pathologie, surtout dans les pays en voie de développement est probablement due au stade asymptomatique de cette pathologie dans environ 66% des cas. On estime qu'entre 2-3% de la population mondiale étaient infectés par HCV en 2010 et que 22% des patients atteints de carcinome hépatocellulaire l'ont développé

suite à une infection par HCV. La prévalence de l'hépatite C en France était de 1,3% en 2010, ce pourcentage est en baisse depuis suite à l'introduction des nouveaux traitements (figure 1) (Lavanchy, 2011).

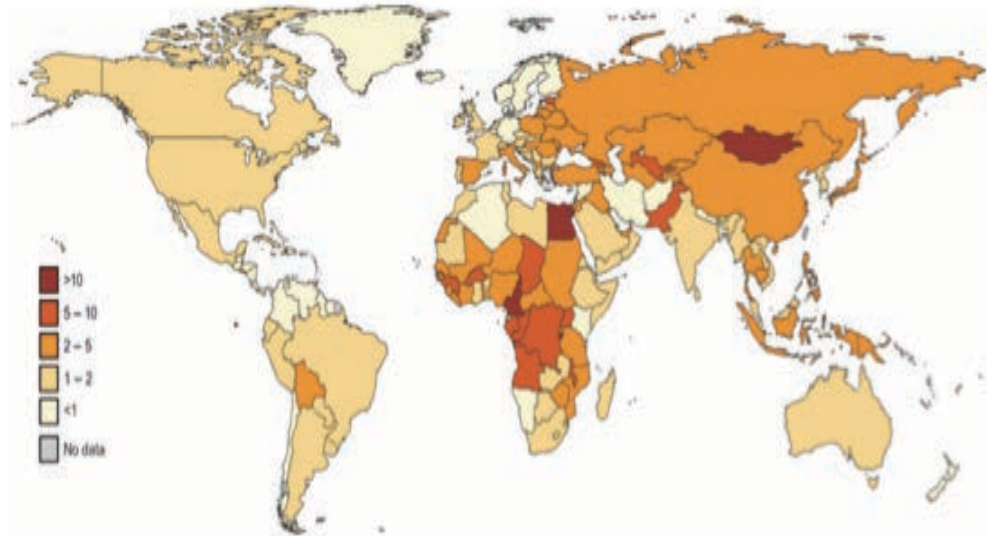


Figure 1 : Epidémiologie de HCV et sa répartition sur la surface du globe (Lavanchy, 2009).

3) Modes de transmission

HCV se transmet essentiellement par voie parentérale via 3 méthodes de contamination : contamination post-transfusionnelle, toxicomanie intraveineuse et contamination nosocomiale.

a) Contamination post-transfusionnelle

Les transfusions sanguines accompagnées d'hépatites ont participé à la découverte de HCV. Depuis les années 1990, des tests additifs ont été mis en place pour pouvoir détecter d'éventuelles contaminations du sang par HCV. Ces techniques ne sont encore pas assez appliquées dans les pays en voie de développement causant encore des cas de contamination par HCV suite à des transfusions sanguines.

b) Transmission par voie intraveineuse

La transmission de l'hépatite C par voie intraveineuse, essentiellement pour les usagers de seringues ou matériels tranchants contaminés, constitue une méthode de transmission assez fréquente (Lavanchy, 2009). Des campagnes de prévention ont été mises en place afin d'expliquer les risques aux usagers de seringues. Des "*sites d'injection supervisée*" ont été récemment mis en place en France permettant aux usagers de drogues par voie intraveineuse de venir pratiquer leur injection en présence d'un personnel médical formé.

c) Transmission par voie nosocomiale

La transmission de HCV par voie nosocomiale présente un risque non négligeable. Entre 10-33% des patients hémodialysés sont infectés par HCV (Lavanchy, 2009). On pense que le facteur majeur qui a conduit aux forts pourcentages d'infection par HCV en Egypte (14% de la population infectée par HCV en 2010) serait l'absence de stérilisation et la réutilisation du matériel médical lors d'une campagne de traitement de la schistosomiase par le tartrate d'antimoine administré par voie intraveineuse (Frank *et al.*, 2000). Des cas de contamination sexuelle, familiale et périnatale ont été décrits mais restent assez rares. HCV peut être aussi transmis pendant certaines pratiques culturelles tel que l'acupuncture, les piercings ainsi que les tatouages si le matériel utilisé est contaminé. Les nouvelles règles d'hygiène et de sécurité limitent énormément la transmission de HCV par accident professionnel aussi bien dans le milieu hospitalier médical que dans les centres de recherche.

4) Evolution et étapes de la pathogenèse

L'hépatite C est une pathologie chronique à évolution lente qui peut s'étendre jusqu'à 30 ans avant d'atteindre les stades les plus avancés. Suite à l'infection par HCV une hépatite aiguë peut être détectée. Cette dernière peut évoluer dans environ 80% des cas vers la chronicité. A ce stade 20% des personnes infectées sont guéries par un processus encore mal connu. Parmi les patients ayant

développé une hépatite chronique, seulement 20% développeront une cirrhose et 1-4% des patients cirrhotiques développeront un carcinome hépatocellulaire. Les pourcentages d'évolution sont représentés dans la figure 2.

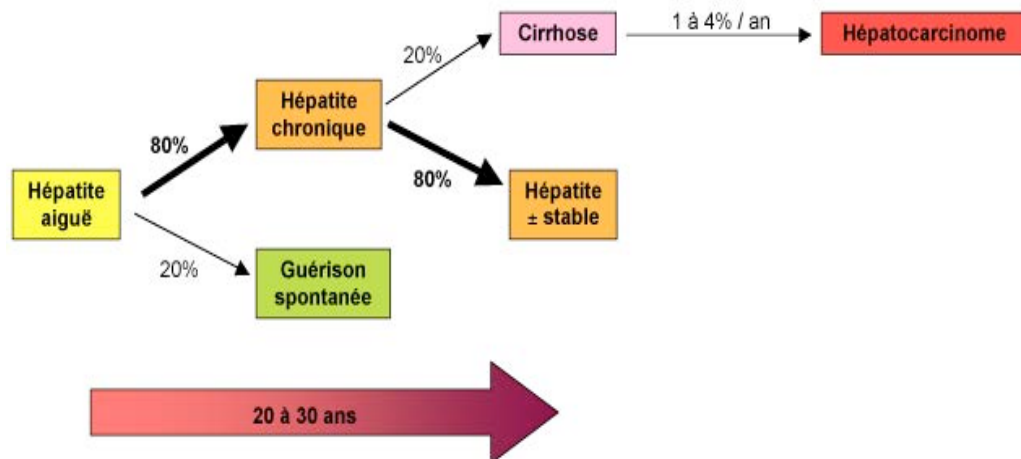


Figure 2 : Différents stades d'évolution de l'hépatite C

a) L'hépatite aigüe C

L'infection par HCV entraîne l'apparition d'une hépatite aigüe qui est souvent asymptomatique avec seulement un faible pourcentage des patients (25%) qui développent des symptômes cliniques très variables. A ce stade, seul les examens supplémentaires permettent de déterminer une infection par HCV (Santantonio *et al.*, 2008).

i. Quantification de l'ARN viral de HCV

1 à 3 semaines suite à l'infection par HCV la détection de l'ARN viral devient détectable dans le sang des patients infectés par une RT-PCR quantitative.

ii. Élévation des transaminases hépatiques et apparition des premiers signes cliniques

A partir de la deuxième semaine post-infection, les signes cliniques affirmant une hépatite commencent à apparaître. Une élévation des transaminases hépatiques

est la plus courante. Elle s'accompagne parfois de l'apparition de certains signes cliniques comme la nausée, la fatigue, la jaunisse, la fièvre et des douleurs abdominales... Ces signes sont assez variables selon le génotype viral et le système immunitaire du patient (Bowen & Walker, 2005),(Santantonio *et al.*, 2008).

iii. Apparition des anticorps anti-HCV

La séroconversion est observée suite à une virémie active, causée par la réplication de l'ARN HCV dans les cellules infectées. Des anticorps spécifiques anti-HCV dirigés par l'hôte commencent à être détectés dans le plasma du patient (Bowen & Walker, 2005).

A ce stade 20% des patients environ sont capables de neutraliser l'infection par un mécanisme mal connu. Cette guérison spontanée, appelée clairance du virus, est validée par l'absence de détection d'ARN HCV dans le sang du patient (Bowen & Walker, 2005).

b) L'hépatite chronique C

La grande majorité des patients (80%) atteints d'hépatite aigüe développent une hépatite chronique. Cette dernière est caractérisée par la persistance de l'ARN viral et de sa réplication active au delà de 6 mois environ post-infection. L'avancement de l'infection vers ce stade reste asymptomatique dans la plupart des cas. L'évolution est favorisée par plusieurs facteurs dont l'âge, le sexe masculin, la consommation d'alcool et la co-infection par d'autres virus notamment le virus de l'hépatite B (HBV) ou le virus de l'immunodéficience humaine (HIV). Elle est aussi dépendante des allèles du gène de l'interleukine 28B (IL28B) (Grebely *et al.*, 2011).

L'augmentation des transaminases hépatiques ainsi que la réplication du virus atteignent un plateau. Plusieurs semaines après le développement de l'hépatite chronique, des symptômes peuvent être perçus, notamment la fatigue, la nausée, la coloration foncée de l'urine ainsi que des douleurs abdominales. A ce stade les atteintes hépatiques commencent à se former et deviennent irréversibles.

Certains patients développent des stéatoses, des fibroses (selon le génotype viral) qui sont à évolution lente nécessitant plusieurs années (Chen & Morgan, 2006).

c) La cirrhose décompensée et le carcinome hépatocellulaire

L'absence de traitement au stade de l'hépatite chronique ne freine pas l'évolution de la pathologie. En effet, cette dernière évolue vers une cirrhose compensée, décompensée et enfin en carcinome hépatocellulaire dans 1-4% des cas. La cirrhose et le carcinome hépatocellulaire causés par HCV sont la cause majeure de transplantation hépatique en Europe (Poynard *et al.*, 2003).

La transplantation hépatique n'est qu'une solution momentanée en absence de toute clairance du virus. Le cas échéant, le nouveau greffon est aussitôt infecté dans une durée inférieure à 5 ans (Rubín *et al.*, 2011).

5) Réponse immunitaire anti-HCV de l'hôte

Une réponse immunitaire spécifique de l'hôte est déclenchée suite à l'infection par HCV. Comme pour la grande majorité des infections, une réponse immunitaire innée de l'hôte est aussitôt déclenchée. Cette dernière se traduit par l'activation des cellules NK, *natural killer*, ainsi que de la voie productrice de l'interféron de type 1. Cette réponse innée précède et prépare la mise en place de la réponse adaptative qui est traduite d'une part par la maturation des lymphocytes B (LB) en plasmocytes sécrétoires d'anticorps spécifiques anti-HCV : réponse humorale ; et d'autre part par l'activation de la division des lymphocytes T (LT) cytotoxiques : réponse cellulaire.

a) La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée est mise en place environ 2 semaines post-infection pendant la phase d'hépatite aigüe. Les récepteurs TLR-3 et RIG-I reconnaissent les composants du virus appelés *PAMPs* (*pathogen-associated*

molecular patterns). En effet TLR-3 reconnaît l'ARN double brin et RIG-I reconnaît les extrémités 5' et 3' non codantes du génome de HCV. L'activation des voies de signalisation par ces deux récepteurs induit la sécrétion de l'IFN- β par les cellules infectées. Un détournement du système immunitaire par le virus peut être observé à ce stade. En effet, l'interaction de la protéine virale E2 recombinante de HCV avec le récepteur CD81 à la surface des cellules NK altère le fonctionnement de ces dernières (Tseng & Klimpel, 2002). Ce résultat reste à confirmer. En effet, dans une étude plus récente, les glycoprotéines d'enveloppe des HCV produites en culture cellulaire ne sont pas capables d'avoir le même effet régulateur sur les NK (Yoon *et al.*, 2008). Cependant, chez les patients présentant une hépatite C chronique, les récepteurs présents à la surface des NK sont sous exprimés, ce qui pourrait expliquer la persistance de l'infection en échappant à la réponse innée (Nattermann, 2006).

D'autres protéines virales participent au détournement de la réponse immunitaire de l'hôte. La protéase virale NS3/4A clive des protéines IPS-1 stimulatrices de la synthèse de l'interféron et les protéines TRIF responsables de la transduction du signal (Li *et al.*, 2005a, b).

La protéine NS5A participe aussi à l'adaptation du virus en inhibant l'activité kinase de la PKR, une protéine kinase cellulaire induite par la présence de l'ARN double brin dans la cellule (Pflugheber *et al.*, 2002).

Différentes formes mutantes de RIG-I et du TLR-3 participent à moduler la réponse innée et par conséquent influent sur la permissivité du virus. Une forme mutée de la protéine RIG-I présente dans un sous clone de la lignée Huh-7 permissive pour le virus, les rend hautement permissives au virus (Sumpter *et al.*, 2005).

b) La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire innée constitue une première barrière de défense de l'hôte contre l'infection, mais régule et participe aussi à la mise en place de la réponse adaptative qui est beaucoup plus spécifique et durable. La réponse

adaptative intervient par plusieurs mécanismes (humorale et cellulaire) et commence à être détectée environ à partir de la quatrième semaine post-infection.

ii) La réponse adaptative cellulaire

Les cytokines sécrétées par les éléments de la réponse innée induisent les cellules dendritiques, qui sont utilisées comme cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Suite à la détection des CPA, la réponse adaptative est mise en place. Elle fait intervenir les LT auxiliaires CD4⁺ et les LT cytotoxiques CD8⁺. Son évolution au cours du temps est représentée dans la figure 3.

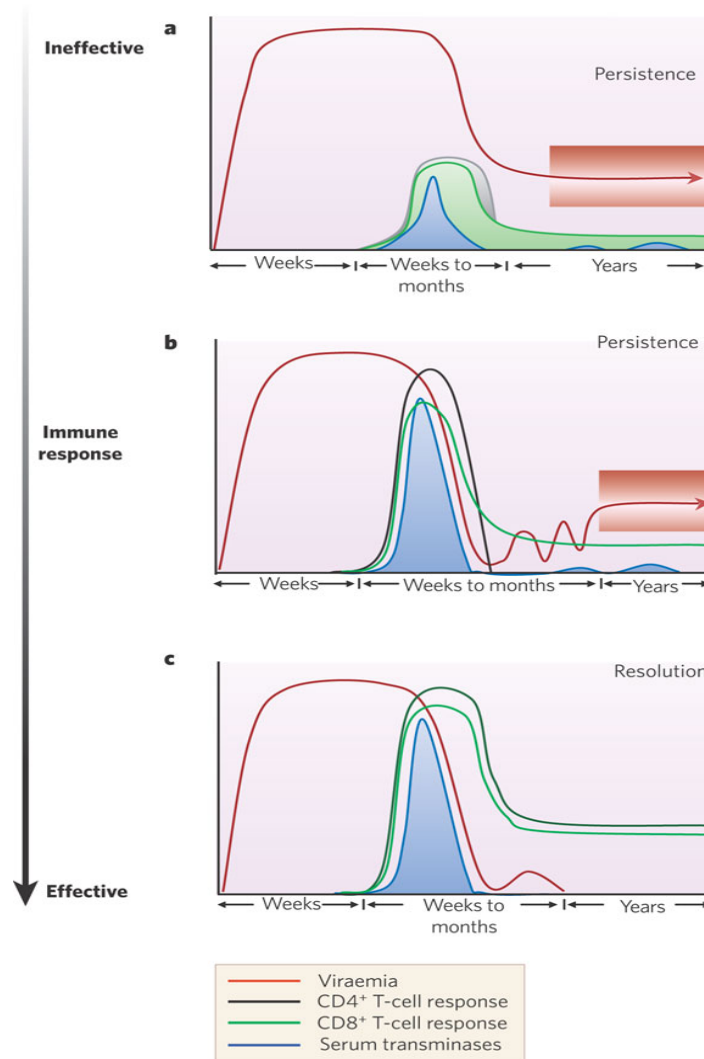


Figure 3 : Représentation schématique de la réponse immunitaire cellulaire au cours de l'infection aiguë par HCV.

a) La virémie (courbe rouge) augmente rapidement et, bien qu'elle diminue après ce pic initial, elle n'est jamais contrôlée. Il s'ensuit l'établissement d'une infection chronique avec une virémie variable chez les différents patients. Dans ces conditions, les réponses CD4⁺ et CD8⁺ (courbes noire et verte respectivement) ainsi que le niveau des transaminases sériques (courbe bleue) évoluent peu et peuvent être faibles, voire absentes. Les courbes pleines indiquent que les réponses peuvent être variables chez les différents patients.

b) La virémie persiste pendant plusieurs semaines en absence de réponse immunitaire cellulaire détectable. L'apparition des réponses CD4⁺ et CD8⁺ est associée à un contrôle temporaire de la virémie ainsi qu'à des variations du niveau des transaminases sériques. Toutefois, après la chute de la réponse CD4⁺, la virémie réapparaît et devient persistante. Une réponse CD8⁺ peut rester détectable malgré l'infection chronique.

c) Bien que la virémie apparaisse rapidement et que les réponses cellulaires apparaissent tardivement, le virus devient indétectable dans le plasma après l'apparition des réponses CD4⁺ et CD8⁺ qui coïncide souvent avec un niveau de transaminases sériques variable. Un rebond de la virémie peut avoir lieu avant la clairance virale (Bowen & Walker, 2005).

L'action de la réponse CD4+ participe à la clairance du virus pendant la phase de l'hépatite aigüe. En effet une réponse CD4+ de type TH1, faisant intervenir les voies de l'IFN- γ et de l'IL-2, est soutenue, rapide, forte et peut aboutir à la clairance du virus; contrairement à une réponse CD4+ de type TH2 qui est beaucoup plus retardée, faible et même transitoire, faisant intervenir les voies de l'IL-4 et de l'IL10 et qui n'arrive pas à bloquer le passage vers la chronicité (Tsai *et al.*, 1997).

La réponse CD8+ vise à inactiver et à éliminer le virus non seulement par la capacité cytolytique des cellules, mais aussi par des effets dits non-cytolytiques qui seraient la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires. Il a déjà été montré que l'infection est capable d'inhiber la prolifération des cellules CD8+, leur fonction cytotoxique et surtout leur capacité à sécréter des cytokines (Neumann-Haefelin *et al.*, 2005).

Une autre caractéristique des cellules CD8+, est qu'elles sont capables de reconnaître différents épitopes dans les protéines virales de HCV (surtout dans NS3 et NS5B). Selon l'épitope ciblé par la réponse cytotoxique, la clairance du virus est plus ou moins variable. Dans les cellules chroniquement infectées, un équilibre entre la réplication virale et la réponse CD8+ est établi permettant de maintenir le niveau de réplication suffisant (Lancaster *et al.*, 2002).

La coordination entre les 2 composants de la réponse cellulaire est nécessaire afin de pouvoir établir une réponse suffisante à la clairance virale.

iii) La réponse adaptative humorale

La réponse humorale commence également à être établie pendant la phase de l'hépatite aigüe, à partir de la quatrième semaine post-infection. Des anticorps dirigés contre les protéines structurales et non-structurales du virus commencent à être détectés dans le sang du patient. Un faible pourcentage de ces anticorps possède une activité neutralisante. L'activité neutralisante de ces anticorps n'est pas claire in-vivo. En fait des patients chroniquement infectés possèdent des anticorps neutralisants. Cette observation peut être expliquée par l'existence d'anticorps non-neutralisants dirigés contre les mêmes épitopes que

les anticorps neutralisants, ou des épitopes chevauchants, et qui pourraient empêcher leur activité neutralisante (Zhang *et al.*, 2007a).

La recherche autour des anticorps neutralisants a été fortement développée suite à la découverte des particules rétrovirales pseudotypées avec les protéines structurales E1 et E2 de HCV (Bartosch *et al.*, 2003b),(Bartosch *et al.*, 2003a), (Lavillette *et al.*, 2005a). La grande majorité des anticorps neutralisants ciblent les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 qui sont ancrées dans la particule virale notamment la région HVR1 de E2 ; vu la grosse variabilité de cette région entre les différents génotypes de HCV, les anticorps ciblant cette région sont limités par la variabilité génétique (Farci *et al.*, 1996). Le deuxième recours utilisé par le virus pour échapper aux anticorps neutralisant serait de faire varier le niveau de glycosylation au niveau des glycoprotéines d'enveloppe (Helle *et al.*, 2007), ainsi que de varier leur association aux lipoprotéines. Les anticorps neutralisants peuvent être dirigés contre d'autres protéines virales aussi. Il semble qu'il y ait dans les phases précoces de l'hépatite C une production massive d'anticorps neutralisants ciblant la région HVR1 de la glycoprotéine d'enveloppe E2, tandis que au fur et à mesure de l'évolution de la pathologie nous observons une production d'anticorps neutralisants à large spectre d'action (Hahn *et al.*, 2007). Contrairement à la réponse adaptative cellulaire, la participation de la réponse humorale faisant intervenir des anticorps neutralisants dans la clairance virale est controversée. Des études suggèrent qu'une forte production d'anticorps neutralisants pendant les phases précoces de l'infection aboutit à la clairance virale (Lavillette *et al.*, 2005a),(Pestka *et al.*, 2007), tandis qu'une infection de chimpanzés en présence d'anticorps neutralisants ayants guéri une première infection est possible (Farci *et al.*, 1992).

6) Evolution de la thérapie de l'hépatite C

Avant l'identification en 1989 de l'agent responsable de l'hépatite C, il a été relevé que chez les patients souffrants d'une hépatite une diminution de la production d'IFN a été observée. Pour cela le premier recours thérapeutique a été d'administrer de l'IFN aux patients dans le but de combler le déficit observé suite à l'infection (Hoofnagle *et al.*, 1986).

L'IFN agit comme antiviral en facilitant l'accès aux cellules du système immunitaire au site d'infection et en augmentant l'activité cytotoxique des cellules CD8+, en améliorant les cellules CD4+ mémoires et en modulant l'expression en surface de certaines protéines du CMH (Feld & Hoofnagle, 2005). La ribavirine est un analogue nucléosidique de la guanosine avec un large spectre d'action. Elle a été utilisée avec l'IFN en bithérapie puisqu'elles avaient un effet synergique. La ribavirine favorise l'action de la voie TH1 de la réponse adaptative CD4+ qui semble pousser la balance vers la clairance virale. Elle participe aussi au blocage de la traduction virale et à la diminution des stocks de GTP nécessaire à la réplication de HCV (Galmozzi *et al.*, 2012)

a) La bithérapie contre l'hépatite C

L'administration de l'IFN- α couplée à la ribavirine a été pendant plusieurs années la bithérapie utilisée contre l'hépatite C. Cependant cette thérapie présente plusieurs effets secondaires dont le temps du traitement qui s'étendait sur plusieurs mois, la demi-vie courte de l'IFN qui oblige l'administration très fréquente, les effets indésirables de l'IFN plus précisément et la variabilité de l'efficacité selon le génotype du virus.

Des améliorations ont été apportées pendant ces dernières années à l'IFN- α en la couplant à une molécule de polyéthylène glycol (PEG) qui permettrait d'augmenter la demi-vie de l'IFN et par conséquent diminuer la fréquence d'administration aux patients. Cette nouvelle thérapie serait à l'origine d'une réponse virologique soutenue (RT-qPCR négative pour l'ARN HCV) variant de 6-12 mois selon le génotype viral (Poynard *et al.*, 2003).

Les nombreux effets secondaires, le coût élevé, la différence d'effet vis à vis des génotypes et la non-spécificité de la bithérapie nous poussent à la recherche d'une nouvelle thérapie contre l'hépatite C qui serait dépourvue d'IFN et ciblant plus précisément le virus.

b) La trithérapie contre l'hépatite C

La bithérapie contre l'hépatite C ciblait toujours l'immunité de l'hôte en régulant la réponse immunitaire contre le virus et en facilitant la cytotoxicité des cellules CD8+. Pour augmenter l'efficacité de cette thérapie, il serait nécessaire donc d'utiliser des molécules ciblant directement les protéines virales ou leurs fonctions.

Depuis 2011, deux molécules sont utilisées en trithérapie et approuvées par la FDA et EMA ; le bocéprévir et le télaprévir. Ces molécules inhibent l'activité de la protéase virale NS3 en inhibant le clivage de la polyprotéine de HCV nécessaire à l'initiation de la réplication de l'ARN (Reesink *et al.*, 2006), (Poordad *et al.*, 2011).

L'administration de ces deux inhibiteurs en complément de la bithérapie classique permet d'augmenter l'efficacité du traitement de 40 à 70% pour les génotypes les plus difficiles. L'inconvénient majeur de ces 2 molécules est qu'elles ne peuvent pas être utilisées en monothérapie, puisque des virus résistants au télaprévir ont été observés seulement 14 jours après le début du traitement (Reesink *et al.*, 2006).

L'utilisation de ces 2 nouvelles molécules améliore nettement l'efficacité du traitement mais augmente aussi les effets indésirables dus à l'IFN, d'où la nécessité de trouver des traitements dépourvus d'IFN

c) La révolution du traitement de l'hépatite C

Les données accumulées pendant plusieurs années sur le cycle viral de HCV, ainsi que sur les facteurs et les mécanismes que le virus utilise pendant les différentes étapes de son cycle, ont facilité la recherche de molécules antivirales ciblant aussi bien le virus que l'hôte. On parle de DAA (*direct-acting antiviral*) pour toute molécule qui cible directement les protéines virales ou leur fonction et de HTA (*host-targeted agents*) pour toute molécule ciblant un facteur de l'hôte nécessaire ou détourné par le virus à son profit.

Les différentes classes sont représentées dans la tableau 1 Ces molécules ciblent des facteurs cellulaires ou viraux différents. Leur combinaison aurait un effet synergique ou additif entre elles ou avec l'IFN. Le risque d'émergence de

nouveaux virus résistants au traitement ainsi que l'efficacité selon les génotypes sont différents selon chaque molécule (Pawlotsky, 2014).

d) Futures stratégies

La combinaison de ces nouvelles molécules entre elles et avec l'IFN est efficace pour le traitement de l'hépatite C. Cependant vu les effets indésirables de l'IFN, des futurs traitements planifient d'arrêter l'IFN. Elles sont combinées ou pas à la ribavirine. Ces molécules sont présentées dans le tableau 2 (Pawlotsky, 2014).

e) Tentatives de vaccination

Malgré les avancées dans le traitement de l'hépatite C, la prévention par vaccin reste le but majeur. Les tentatives de développer un vaccin sont confrontées souvent au problème de l'hétérogénéité du virus. 7 génotypes de HCV ont été décrits pour l'instant présentant une grande différence notamment au niveau des glycoprotéines d'enveloppe. De plus le virus circule sous la forme de quasi-espèces au sein d'un même patient.

Des essais de vaccination ont été réalisés sur des chimpanzés avec des hétérodimères purifiés de E1E2. Une production d'anticorps ainsi qu'une induction de la réponse cellulaire ont été observés (Choo *et al.*, 1994).

Une autre étude plus récente montre que l'utilisation de pseudo-particules chimériques portant à leur surface les glycoprotéines d'enveloppe E1E2 de HCV, induit une production massive d'anticorps neutralisants aussi bien chez la souris que chez le macaque (Garrone *et al.*, 2011).

Depuis quelques années, des études ont montrées que la fusion d'une protéine E1 ou E2 de HCV à la protéine S de HBV n'influence pas l'assemblage et la sécrétion des particules sub-virales produites par les cellules exprimant la protéine S. Ces particules chimériques HBV-HCV contiennent à leur surface les glycoprotéines E1E2 ayant un pouvoir immunogène contre HCV (Patent *et al.*, 2009). Cette stratégie permet d'avoir une production d'anticorps neutralisants nécessaires à la clairance virale, ce qui la rend utile pour une utilisation prophylactique (Beaumont *et al.*, 2013).

Tableau 1 : différentes classes d'inhibiteurs de HCV en stades cliniques (Pawlotsky, 2014)

Agent class	Generation	Compound	Manufacturer	Phase of clinical development
NS3-4A protease inhibitors	First-wave, first-generation	Telaprevir	Vertex, Janssen, Mitsubishi	Approved
		Boceprevir	Merck	Approved
	Second-wave, first-generation	Simeprevir	Janssen	Approved
		Faldaprevir	Boehringer-Ingelheim	III
		Asunaprevir	Bristol-Myers Squibb	III
		ABT-450/r	Abbvie	III
		Danoprevir/r	Roche	II
		Sovaprevir	Achillion	II ^a
		Vedoprevir	Gilead	II
		IDX320	Idenix	II
		Vaniprevir	Merck	III (Japan)
	Second-generation	MK-5172	Merck	III
		ACH-2684	Achillion	II
Nucleoside/nucleotide analogues	Nucleotide analogues	Sofosbuvir	Gilead	Approved
		VX-135	Vertex	II ^b
	Nucleoside analogue	Mericitabine	Roche	II
Non-nucleoside inhibitors of the HCV RdRp	Thumb domain I inhibitors	BMS-791325	Bristol-Myers Squibb	III
		TMC647055	Janssen	II
	Thumb domain II inhibitors	Lomibuvir	Vertex	II
		GS-9669	Gilead	II
	Palm domain I inhibitors	Dasabuvir	Abbvie	III
		ABT-072	Abbvie	II
		Setrobuvir	Roche	II
NS5A inhibitors	First-generation	Daclatasvir	Bristol-Myers Squibb	III
		Ledipasvir	Gilead	III
		Ombitasvir	Abbvie	III
		PPI-668	Presidio	II
		PPI-461	Presidio	II
		ACH-2928	Achillion	II
		GSK2336805	GlaxoSmithKline	II
		BMS824393	Bristol-Myers Squibb	II
	Second-generation	Samatasvir	Idenix	II
		MK-8742	Merck	II
		ACH-3102	Achillion	II
		GS-5816	Gilead	II
Cyclophilin inhibitors	First-generation	Alisporivir	Novartis	II ^c
		SCY-635	Scynexis	II
Antagonist of miRNA-122	First-generation	Miravirsen	Santaris	II

Tableau 2 : molécules en essai clinique pour un traitement sans IFN
(Pawlotsky, 2014).

Strategy	Company	Nucleoside/nucleotide analogue	NS3-4A protease inhibitor	NS5A inhibitor	Non-nucleoside inhibitor of HCV RdRp	Cyclophilin inhibitor	Ribavirin
Nucleoside/nucleotide analogue-based strategy	Gilead	Sofosbuvir		Ledipasvir			±
	Gilead	Sofosbuvir		GS-5816			±
	Gilead	Sofosbuvir		Ledipasvir	GS-9669		-
	Gilead	Sofosbuvir	Vedoprevir	Ledipasvir			-
	Gilead/Janssen	Sofosbuvir	Simeprevir				±
	Gilead/Bristol-Myers Squibb	Sofosbuvir		Daclatasvir			±
	Vertex	VX-135			Lomibuvir		
	Vertex/Janssen	VX-135	Simeprevir				±
	Vertex/Bristol-Myers Squibb	VX-135		Daclatasvir			±
	Roche (emerging markets)	Mericitabine	Danoprevir/r		Setrobuvir		±
Nucleoside-free triple combo strategy	Abbvie		ABT-450/r	Ombitasvir	Dasabuvir		±
	Bristol-Myers Squibb		Asunaprevir	Daclatasvir	BMS791325		±
	Boehringer-Ingelheim/Presidio		Faldaprevir	PPI-668	? ^a		±
	Janssen/GlaxoSmithKline		Simeprevir	GSK2336805	TMC647055		±
	Janssen/Idenix		Simeprevir	Samatasvir	TMC647055		±
Nucleoside-free double combo strategy with a high-barrier-to-resistance drug	Merck		MK-5172	MK-8742			±
	Achillion		ACH-2684	ACH-3102			±
	Novartis					Alisporivir	±

B. Le virus de l'hépatite C

1) Classification du virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C est classé dans la famille des *Flaviviridae* sous le genre *Hepacivirus* (Choo *et al.*, 1989). Son génome constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive, effectue sa réplication par une ARN polymérase ARN-dépendante dépourvue d'une activité de correction. On estime que 10^{12} virions sont produits par jour avec une fréquence d'erreur de la polymérase de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} erreur par nucléotide. Ceci serait la cause majeure d'un grand pourcentage de mutation et par conséquent la présence de quasi-espèces au sein d'un même patient (Neumann, 1998). La présence de quasi-espèces

virales au sein d'un même individu participe à l'échappement à la réponse immunitaire (Hahn *et al.*, 2007).

Sept génotypes ont été décrits pour HCV, avec une répartition mondiale différente pour chaque génotype (Gottwein *et al.*, 2009). Selon l'OMS en 2009, le génotype 4 est majoritaire en Egypte, alors que le génotype 5 est majoritaire en Afrique du sud. En Amérique du nord et en Europe les 2 génotypes majoritaires sont le 1a et le 1b.

2) Propriétés de la particule virale de HCV

La composition des particules virales de HCV isolées à partir des sera de patients sont assez hétérogènes (Andre *et al.*, 2002). Ces particules virales sont constituées de virus associés à des lipoprotéines d'où l'appellation lipovirions (LVP) (Bartenschlager *et al.*, 2011). Il semblerait que les lipoprotéines formant les LVP appartiennent aux lipoprotéines de faible densité (LDL), ou de très faible densité (VLDL), puisque les LVP peuvent être immunoprécipitées par des anticorps dirigés contre les apolipoprotéines B et E (ApoB et ApoE) (Nielsen *et al.*, 2006). Ces données témoignent d'une liaison étroite entre la voie de sécrétion des lipoprotéines de faible densité et la voie d'assemblage viral (Huang *et al.*, 2007). Les lipoprotéines présentes dans les LVP sont importantes puisqu'elles conditionnent leur infectiosité. Il a été montré que les LVP de très faible densité étaient beaucoup plus infectieuses que celles ayant une densité intermédiaire (Vieyres *et al.*, 2010). La présence des lipoprotéines dans la LVP participe aussi bien au processus d'échappement du virus au système immunitaire qu'à l'attachement de la particule à ses récepteurs de surface et à sa capacité fusogène (Haid *et al.*, 2009).

La particule virale représentée dans la figure 4, est un virus enveloppé, de forme sphérique d'un diamètre de 60 nm environ (Kaito *et al.*, 1994). L'enveloppe virale, provient de la cellule, dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe E1, E2. Dans cette enveloppe se trouve la nucléocapside virale formée par la protéine de capsid ou core. Le matériel génétique protégé par cette enveloppe est un ARN monocaténaire de polarité positive. Une étude récente montre l'association de ApoE aux particules HCV. Il semble que ApoE est

exposée à l'extérieur de la LVP, tandis que la glycoprotéine E2 est plutôt sous-jacente. Ce fait explique le rôle de ApoE dans l'étape d'attachement du virus (Catanese *et al.*, 2013). Chez les patients, les particules virales sont associées au apolipoprotéines E et B. Dans le système culture cellulaire, l'association de ces apolipoprotéines avec la membrane virale est encore peu connue. Il semble que ApoE et ApoB colocalisent seulement dans le RE avec les glycoprotéines d'enveloppe E1, E2 de HCV. Ceci révèle un lien étroit qui sera responsable de la formation des LVP de HCV (Boyer *et al.*, 2014).

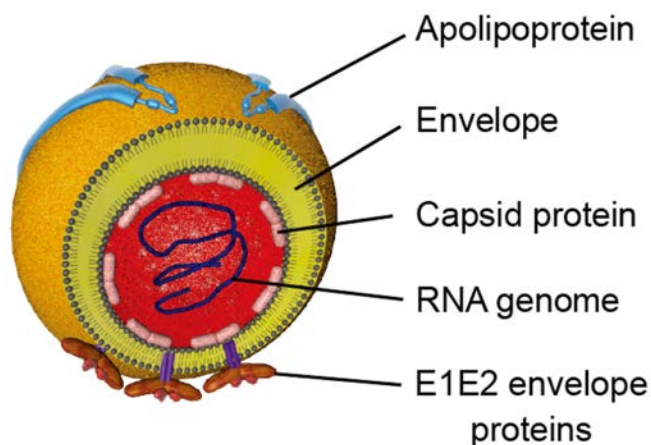


Figure 4 : modèle représentant la LVP de HCV (Fénéant *et al.*, 2014)

3) Organisation du génome de HCV

L'ARN de HCV est un ARN de 9,6 kb entouré de 2 régions non-codantes en 3' et 5' qui sont hautement conservées et importantes pour la réplication et la traduction. Il contient un cadre de lecture codant une polyprotéine de 3000 acides aminés (a.a.) environ. Les clivages co et post-traductionnels de cette polyprotéine par des protéases virales et cellulaires aboutissent à la formation de 10 protéines (figure 5). 3 d'entre elles sont dites structurales ; elles forment la particule virale, il s'agit de la protéine de capsid core et des glycoprotéines d'enveloppe E1, E2. Les 7 autres protéines (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) sont dites non-structurales ; leur expression est cruciale pour les étapes de réplication et d'assemblage de HCV. Il a été déjà évoqué qu'un décalage du cadre

de lecture au niveau de la séquence codant la protéine de capside, pourrait aboutir à la formation d'une protéine additionnelle dénommée protéine F ou ARFP.

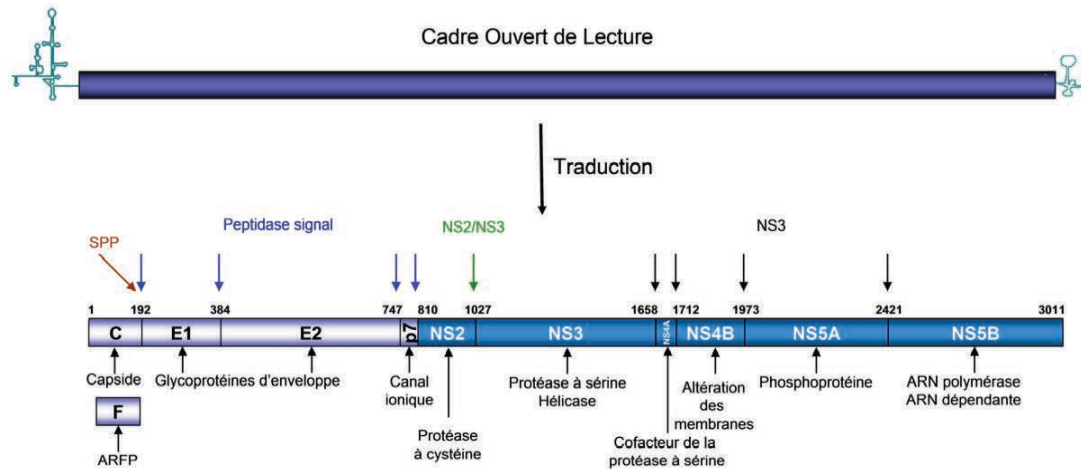


Figure 5 : Organisation du génome de HCV

L'ARN génomique est constitué d'un cadre de lecture ouvert (en violet foncé) encadré de deux régions non codantes (en turquoise). Ce cadre est traduit en une polyprotéine unique qui est clivée par la peptidase de signal peptide (SPP) (flèche marron), des signal-peptidases cellulaires (flèches bleues) et les protéases virales (NS2/3 (flèche verte) et NS3/4A (flèches noires)). Les protéines structurales sont représentées en violet clair et les protéines non-structurales en bleu. Les sites de clivage indiqués correspondent à ceux de la souche H77 (génotype 1a ; numéro d'accès AF009606). Adapté de (Lindenbach & Rice, 2005)

a) Les régions non-codantes du génome de HCV

i) La région 5' non-codante (5' NC)

La région 5' non-codante composée de 341 nucléotides est hautement conservée entre les génotypes viraux de HCV. Elle est composée de 4 domaines (I à IV). Les 115 premiers nucléotides forment les domaines I et II. Des signaux cruciaux pour la réplication virale sont présents dans ces 2 domaines, mais leur action nécessite la présence de l'intégralité de la région 5' NC pendant la réplication (Kim *et al.*, 2002),(Friebe *et al.*, 2001). Un site interne d'entrée des ribosomes (IRES) commence dans le domaine II et se termine dans la séquence codante. Le

recrutement de la sous-unité ribosomale 40S se fait à ce niveau pour initier la traduction de l'ARN (Pestova *et al.*, 1998). Il a été décrit que des micro-ARN des cellules hépatiques régulent la traduction du génome de HCV notamment le miR-122 qui se lie à la région 5' NC de HCV (Niepmann, 2009). Des antagonistes de la région de liaison du miR-122 sont en phase II d'essai clinique dans le cadre d'un nouveau traitement pour l'hépatite C (Pawlotsky, 2014).

ii) La région 3' non-codante (3' NC)

Contrairement à la région 5' NC, la région 3' NC est beaucoup moins conservée entre les différents génotypes de HCV. Sa taille, en moyenne 250 nucléotides, est variable et peut être divisée en 3 domaines : le premier domaine peu conservé de 40 nucléotides environ, le deuxième domaine est un motif poly-uracile/pyrimidine et le troisième domaine, de 98 nucléotides (Kolykhalov *et al.*, 1996), semble être le plus conservé et constitué de 3 tiges-boucles est aussi appelé X-tail (Tanaka *et al.*, 1996). Il semble que les séquences conservées dans la région 3' NC sont nécessaires à la réplication (Yi & Lemon, 2003) (Kolykhalov *et al.*, 2000) et à la traduction de l'ARN HCV (Song *et al.*, 2006).

b) Les protéines structurales

i) La protéine de capsid C (core)

La protéine de capsid est une petite protéine riche en proline et en acides aminés basiques (arginine et lysine), ces résidus sont très conservés. La forme mature est obtenue suite à 2 clivages : le premier clivage produit une forme immature de 23 kDa suivi d'un deuxième clivage produisant la forme mature de 21 kDa (Okamoto *et al.*, 2008). Une peptidase signal clive à l'extrémité C-terminale pour donner la forme intermédiaire, ensuite l'action d'une peptidase de peptide signal effectue le deuxième clivage qui aboutit à la forme finale de la protéine (McLauchlan, 2000).

La protéine de capsid est constituée de 2 domaines, le premier (1-118 a.a.) est hydrophile, peut se lier à l'extrémité 5' NC, contient des a.a. basiques qui sont

indispensables à la formation de la nucléocapside des nouveaux virions (Klein *et al.*, 2005). Ce domaine semble réguler la formation des microtubules en se liant *in vitro* à la tubuline qui peut être nécessaire à la localisation de core (Roohvand *et al.*, 2009). Les a.a. basiques situés en position N-terminale du premier domaine de la capsid sont indispensables à l'étape d'assemblage et de sécrétion des virions (Alsaleh *et al.*, 2010).

Le deuxième domaine (119-174) est hydrophobe et assure la maturation du premier domaine. Il est composé de 2 hélices α séparées par une boucle hydrophile. Il est responsable des propriétés membranaires de la protéine de capsid (Boulant *et al.*, 2005). La protéine de capsid est localisée au niveau des membranes associées aux gouttelettes lipidiques (Rouillé *et al.*, 2006). L'association de la capsid aux gouttelettes lipidiques est nécessaire pour l'étape d'assemblage et de sécrétion des nouveaux virions (Miyanari *et al.*, 2007).

A côté de ses fonctions de régulation de la production virale, la protéine de capsid pourrait avoir des effets sur des protéines cellulaires régulatrices de la réponse immunitaire et de l'apoptose (Nguyen *et al.*, 2006).

ii) La protéine F

Un décalage dans le cadre de lecture au cours de la traduction de l'ARN peut se produire. Il aboutit à la formation d'une protéine additionnelle appelée ARFP (*alternative reading frame protein*) ou F. Elle résulte d'un décalage du cadre de lecture -2/+1 au niveau d'une séquence de glissement correspondant aux codons 8- 11 de la séquence codante de la protéine C. Des anticorps dirigés contre cette protéine peuvent être trouvés dans les séra de patients chroniquement infectés indiquant que cette protéine peut être exprimée de manière naturelle pendant l'infection (Xu *et al.*, 2001).

D'autres études suggèrent la présence des sites alternatifs d'initiation de la traduction qui peuvent être l'origine de cette protéine (Vassilaki, 2003). C'est une petite protéine de 160 a.a. environ et d'une demi-vie courte (≈ 10 min) (Roussel *et al.*, 2003).

iii) Les glycoprotéines d'enveloppe E1, E2

2 glycoprotéines d'enveloppe E1 (192-383) et E2 (384-746) résultent du clivage de la polyprotéine HCV par des signal-peptidases cellulaires. Ces deux protéines sont aussi bien nécessaires à l'étape d'attachement de la particule, de liaison des récepteurs et de fusion de la particule (Cocquerel, 2006). Une fois matures E1 fait 31 kDa et E2 fait 70 kDa, elles sont aussi hautement N-glycosylées (Grakoui *et al.*, 1993).

Les glycoprotéines d'enveloppe de HCV sont des protéines membranaires de type 1 ; elles ont un ectodomaine en N-terminal glycosylé en plusieurs sites, et un passage transmembranaire en C-terminal. Ils subissent des modifications post-traductionnelles dans la lumière du RE. E1 et E2 s'associent en hétérodimères non covalents dans les cellules infectées et sont présentes sous forme de complexes liés par des ponts disulfures à la surface des virions. Il a été montré que seuls les hétérodimères non covalents sont la forme fonctionnelle nécessaire à l'entrée de HCV (Deleersnyder *et al.*, 1996) (Op De Beeck *et al.*, 2004) (Bartosch *et al.*, 2003a). Cependant, ces données ont été bouleversées suite à la découverte du système HCVcc. En effet dans ce système l'hétérodimère E1E2 est lié par des liaisons covalentes et stabilisés par des ponts disulfures (Vieyres *et al.*, 2010).

Les glycoprotéines E1 et E2 sont hautement N-glycosylées : E1 contient 6 sites de N-glycosylation dont 4 sont conservés dans tous les génotypes, tandis que E2 contient 11 sites dont 9 conservés. Ces glycosylations sont importantes et évoquent un rôle des N-glycanes dans l'étape d'entrée de HCV (Goffard *et al.*, 2005). Elles sont aussi importantes pour la conformation et l'hétérodimérisation évoquées précédemment (Meunier *et al.*, 1999). Elles participent aussi à l'échappement contre les anticorps neutralisants (Helle *et al.*, 2007).

La structure de la glycoprotéine E2 de HCV est essentielle à l'étape d'entrée. Elle interagit avec les récepteurs SR-BI et CD81 (Cocquerel *et al.*, 2006). E2 est généralement la protéine la plus ciblée par les anticorps neutralisants. Il avait été suggéré que E2 appartient à la classe II des protéines de fusion virales (Krey *et al.*, 2010). Cependant, la structure tridimensionnelle d'une partie de l'ectodomaine de E2 a été récemment déterminée par deux groupes (Kong *et al.*,

2013) (Khan *et al.*, 2014). Elle n'a révélé aucune homologie structurale avec les protéines de classe II. Au contraire, E2 adopte une structure globulaire compacte constituée majoritairement par des feuillets β et d'une boucle entourée de 2 hélices α . Les résultats de ces études structurales suggèrent que E2 n'est pas la protéine de fusion (Kong *et al.*, 2013) (Khan *et al.*, 2014). On peut donc faire l'hypothèse que la fusion est catalysée par E1 soit seule soit en interaction avec E2, comme suggéré précédemment (Lavillette *et al.*, 2007).

a) Les protéines non-structurales

i) La protéine p7

La protéine p7 est une petite protéine de 63 résidus (747-809). 2 clivages de part et d'autre (C-terminal et N-terminal) de p7 sont réalisés par des signal-peptidases cellulaires. Il a déjà été évoqué que des défauts de clivages sur les 2 extrémités peuvent être observés, donnant des protéines E2/p7 et p7/NS2 (Carrere-Kremer, 2004).

La protéine p7 possède 2 passages transmembranaires séparés par une boucle cytoplasmique de charge positive (Griffin, 2004). Sa fonction canal ionique est acquise suite à l'association de cette protéine en multimères. Des études de microscopie électronique et de résonnance magnétique nucléaire ont permis de montrer l'association en multimères de p7 (Luik *et al.*, 2009) (Montserret *et al.*, 2010).

Son rôle exact est mal connu mais il semble qu'elle soit nécessaire pour un cycle viral complet de HCV, aussi bien en culture qu'en infection chez le chimpanzé (Jones *et al.*, 2007) (Sakai *et al.*, 2003). La protéine p7 n'est pas impliquée dans la réplication de HCV, toutefois elle est indispensable à l'assemblage et la sécrétion des nouveaux virions (Jones *et al.*, 2007).

Les études d'immunofluorescence montrent que p7 est localisée dans le RE des cellules infectées (Carrere-Kremer, 2004). Son oligomérisation permet la formation d'un canal ionique pour le passage de protons afin d'entretenir le pH

intracellulaire facilitant la production des particules virales (Atoom *et al.*, 2014). Il a été montré récemment par des expériences de co-immunoprécipitation et de FRET en cellules vivantes que p7 interagit d'une manière stable avec NS2 (Popescu *et al.*, 2011a) (Vieyres *et al.*, 2013). Aucune interaction avec core, E2 ou NS5A n'a été détectée (Vieyres *et al.*, 2013). Des expériences de neutralisations avec des anticorps ciblant l'épitope HA fusionné à p7 indiquent que p7 n'est pas incorporé dans la particule virale et par conséquent n'a aucun impact sur l'étape d'entrée virale (Vieyres *et al.*, 2013). Grâce à des constructions chimériques il a été montré que des mutations dans p7 complètent des mutations dans NS2 délétères sur l'infection (Yi *et al.*, 2007), suggérant ainsi que ces mutations compensatoires sont dans le site d'interaction entre ces 2 protéines (Yi *et al.*, 2007). Il semble aussi que p7 régule des étapes tardives d'assemblage des capsides des nouvelles particules, puisque des mutations dans p7 induisent l'accumulation de la capside dans les cellules (Gentzsch *et al.*, 2013).

ii) La protéine NS2

NS2 est une protéine transmembranaire (TM) codée par les résidus 810-1026 de 23 kDa à l'état mature. Elle possède 1 domaine N-terminal membranaire et 1 domaine C-terminal exposé du côté cytosolique de la membrane du RE. Ce dernier forme une auto-protéase à cystéine avec le domaine N-terminal de NS3 (Grakoui *et al.*, 1993). Le clivage entre NS2 et NS3 est crucial pour l'infection *in vivo* (Kolykhalov *et al.*, 2000), ainsi que pour l'établissement de la réplication de HCV en culture cellulaire (Welbourn *et al.*, 2005).

Plusieurs études concernant le nombre de domaines TM de NS2 ont été réalisées. Il semble que NS2 comporte 3 TMD avec une protéase à cystéine dimérique ayant 2 sites actifs (Lorenz *et al.*, 2006). Il a été montré que l'activité d'une chaperonne cellulaire HSP90 induit l'activité enzymatique de NS2 (Waxman *et al.*, 2001). Il a été montré qu'une mutation ponctuelle dans NS2 était suffisante pour abolir l'assemblage de virions (Yi *et al.*, 2009). Une étude récente a montré le rôle crucial de NS2 dans la régulation de l'assemblage via des interactions de NS2 avec des protéines structurales et non-structurales (Popescu *et al.*, 2011a).

iii) La protéine NS3 et son cofacteur NS4A

NS3 est codée par les résidus 1027 à 1657 et fait une taille de 70kDa ; son cofacteur la protéine NS4A est une petite protéine codée par les résidus de 1658 à 1711 de la polyprotéine virale, avec une taille de 8 kDa.

NS3 contient 2 domaines dont l'activité est importante et nécessaire à l'établissement de l'infection. Le premier ayant une activité serine protéase du domaine N-terminal qui doit se lier au cofacteur NS4A pour cliver les protéines en aval. Les deux-tiers de la protéine du côté C-terminal portent une activité hélicase/NTPase (Bartenschlager *et al.*, 1995). La liaison de NS3 avec NS4A aboutit à l'adressage du complexe au RE via le domaine hydrophobe de NS4A (Wölk *et al.*, 2000).

Comme évoqué récemment, la partie N-terminale de NS3 sert de cofacteur indispensable à l'activité protéasique de NS2 pour le clivage entre NS2 et NS3. Le domaine N-terminal de NS3 possède aussi une activité protéasique qui est responsable non seulement du clivage de la polyprotéine HCV, mais sert aussi du clivage des senseurs de l'immunité innée notamment les protéines IPS-1 stimulatrices de la synthèse de l'interféron et les protéines TRIF responsables de la transduction du signal (Li *et al.*, 2005b) (Li *et al.*, 2005a). Ce complexe enzymatique interfère également avec les voies de signalisation RIG-I et TLR-3 en bloquant ainsi la réponse antivirale innée de l'hôte (Li *et al.*, 2005a) (Meylan *et al.*, 2005) (Cheng *et al.*, 2006).

L'énergie nécessaire à l'activité du domaine hélicase de NS3 provient probablement de l'hydrolyse de l'ATP par le domaine NTPase. Il a été montré que ce domaine est aussi important pour la réplication en culture cellulaire et l'infection *in vivo* (Kolykhalov *et al.*, 2000) (Lam & Frick, 2006). Il semble intervenir dans le déroulement des structures secondaires des brins d'ARN ou les ARN doubles brins essentiels pour l'initiation de la réplication (Serebrov & Pyle, 2004). En plus du rôle de NS3 dans l'initiation de la réplication, il a été montré que des mutations dans les sites conservés de NS3 altèrent l'étape d'assemblage viral sans aucun effet sur l'étape de réplication (Ma *et al.*, 2008). Une étude plus

récente évoque un rôle dans l'établissement de l'équilibre entre la réplication et l'assemblage par le complexe NS3/4A (Chatel-Chaix *et al.*, 2011).

L'hyperphosphorylation de NS5A semble être régulée par NS4A, donnant un autre rôle à cette protéine cofacteur de NS3 (Lindenbach *et al.*, 2007).

iv) La protéine NS4B

La protéine NS4B est codée par les résidus 1712-1972 de la polyprotéine, d'une taille de 27 kDa. Elle est ancrée à la membrane du RE et possède 4 domaines TM (Hügler *et al.*, 2001). Chacune des extrémités N-terminale et C-terminale est formée de 2 hélices α initialement orientées vers le cytosol et ayant un rôle important dans la localisation de la protéine au niveau des membranes du RE (Gouttenoire *et al.*, 2009b) (Gouttenoire *et al.*, 2009a) (Elazar *et al.*, 2003). Une fois transloqué dans la lumière du RE, le domaine N-terminal de NS4B induit la formation d'un cinquième domaine TM (Lundin *et al.*, 2003).

La réplication de HCV est associée à des remaniements membranaires "membranous webs" (MW) dans la cellule hôte ; cependant il a été montré que seule l'expression de NS4B était capable d'induire ces remaniements membranaires (Egger *et al.*, 2002).

La formation des MW est dépendante de l'oligomérisation de NS4B, ainsi que de son interaction avec d'autres protéines virales et cellulaires via sa palmitoylation (Gouttenoire *et al.*, 2010) (Yu *et al.*, 2006). Il semble que NS4B participe aussi dans l'hyperphosphorylation de NS5A activatrice de la réplication, puisqu'en présence des mutants de NS4B on ne trouve pas de forme hyperphosphorylée de NS5A.

Une activité NTPasique vient se rajouter aux fonctions de NS4B. En effet l'hydrolyse de l'ATP (GTP) serait nécessaire pour fournir de l'énergie à la réplication (Thompson *et al.*, 2009) (Einav *et al.*, 2004). NS4B participe aussi dans l'étape d'assemblage et de sécrétion puisque des mutants de NS4B altèrent la production des virions (Jones *et al.*, 2009). Son rôle couvre l'activation de l'expression des enzymes du métabolisme lipidique pendant l'infection via l'activation de SREBP (*sterol regulatory element binding proteins*) (Park *et al.*, 2009).

En plus de ses fonctions régulatrices du cycle viral, NS4B participe au détournement du système immunitaire au profit de l'infection et ce en régulant une protéine STING (stimulator of IFN genes) activatrice de la voie RIG-I (Tasaka *et al.*, 2007) (Nitta *et al.*, 2013).

v) La protéine NS5A

La phosphoprotéine NS5A est formée par les résidus de 1973 à 2420. La forme phosphorylée a une taille de 56 kDa, tandis que la forme hyperphosphorylée est à 58 kDa (Grakoui *et al.*, 1993). La partie N-terminale (30 a.a.) forme une hélice amphipatique très conservée, importante pour la localisation de NS5A et pour la réplication virale (Brass *et al.*, 2002). NS5A est un marqueur des complexes de réplication puisqu'elle se localise au niveau des MW, mais aussi associée à la protéine core à proximité des gouttelettes lipidiques (GL) pour l'étape d'assemblage du virus (Miyanari *et al.*, 2007). Le domaine C-terminal de NS5A possède un motif de localisation nucléaire, qui pourrait être clivé par des caspases cellulaires. Ce clivage aboutirait à la translocation de NS5A dans le noyau (Sato *et al.*, 2000). Cependant, la localisation nucléaire de NS5A n'est pas observée dans des expériences d'immunofluorescence à partir de cellules infectées en culture cellulaire.

La partie centrale est divisée en 3 domaines : D1, D2 et D3. Le domaine 1 (D1) est divisé à son tour en 2 sous domaines : le domaine D1-A, riche en a.a. basiques, contient 4 cystéines conservées capables de fixer un ion Zn^{2+} important pour le déroulement de la réplication. La dimérisation de 2 domaines D1-A aboutit à la formation d'une gouttière basique par le domaine D1-B dirigée vers cytosol pour lier l'ARN (Tellinghuisen *et al.*, 2005) (Tellinghuisen *et al.*, 2004). Elle possède aussi une grande affinité pour le domaine poly-uracile/pyrimidine de la région 3' NC de l'ARN (Huang *et al.*, 2005). Dans un temps plus tardif, D1 facilite l'association de NS5A aux GL (Miyanari *et al.*, 2007). Le domaine D2 est moins connu, il contient des résidus conservés essentiels pour la réplication (Tellinghuisen *et al.*, 2008a). Le domaine D3 joue plutôt un rôle dans l'étape d'assemblage en interagissant avec la protéine core (Appel *et al.*, 2008) (Masaki *et al.*, 2008). Les domaines D2 et D3 interagissent avec les protéines cellulaires

notamment des cyclophilines nécessaires à la réplication virale (Hanouille *et al.*, 2009) (Verdegem *et al.*, 2011). En outre, des insertions et des délétions dans NS5A peuvent seulement se faire dans le domaine D3 tout en conservant la réplication virale (Moradpour *et al.* 2004) (Appel *et al.*, 2008).

La phosphorylation de NS5A se fait par plusieurs protéines kinases, dont une protéine kinase cellulaire appelée caséine-kinase II (Kim *et al.*, 1999) et est influencée par les protéines virales NS3, NS4A et NS4B (Koch & Bartenschlager, 1999). L'hypersphosphorylation de NS5A se lie et piège VAP-A (protéine du RE nécessaire à la réplication virale) et par conséquent régule négativement la réplication (Evans *et al.*, 2004). NS5A semble jouer le rôle dans le maintien de l'équilibre entre la réplication et l'assemblage puisque la phosphorylation de résidus dans son domaine C-terminal s'avère être nécessaire pour la production virale (Appel *et al.*, 2005) (Liu, 2006).

En plus de ses activités régulatrices du cycle viral (réplication, assemblage) NS5A participe à la régulation du système immunitaire de l'hôte en régulant plusieurs voies de signalisation (Macdonald & Harris, 2004).

vi) La protéine NS5B

NS5B est l'ARN polymérase ARN-dépendante de HCV, d'une taille de 68 kDa. Elle est codée par les résidus 2421-3011 de la polyprotéine. Elle appartient à la famille des ARN polymérases ARN-dépendantes grâce à son motif Gly-Asp-Asp (Lohmann *et al.*, 1997).

L'extrémité C-terminale de NS5B conditionne son ancrage à la membrane d'une manière post-traductionnelle. (Lee *et al.*, 2004). Ce phénomène est indispensable à la réplication de l'ARN (Moradpour *et al.*, 2004).

L'oligomérisation de NS5B et la présence de cations (Mg^{2+} et Mn^{2+}) sont nécessaires à son activité enzymatique qui catalyse l'élongation de 150-200 nucléotides par minute (Lohmann *et al.*, 1998) (Qin *et al.*, 2002). La structure tridimensionnelle de NS5B montre l'organisation en forme de « main droite » avec 3 domaines nommés « doigts », « pouce » et « paume » (Bressanelli *et al.*, 1999).

L'interaction du domaine « pouce » et domaine « doigts » forme un passage permettant l'arrimage de l'ARN au site actif catalytique : la « paume » (Bressanelli *et al.*, 2002). La polymérase de HCV ne possède pas d'activité de correction des erreurs ce qui participe énormément à la diversité des génotypes et des quasi-espèces virales de HCV. En plus de son activité enzymatique comme ARN polymérase, NS5B interagit avec des protéines cellulaires et virales. Il semble que NS5B soit régulée par NS5A (Shirota *et al.*, 2002).

L'interaction de NS5B avec la cyclophiline A est nécessaire pour la réplication de HCV (Kaul *et al.*, 2009) et constitue une bonne cible thérapeutique. Des inhibiteurs de cette interaction existent en clinique (Pawlotsky, 2014). NS5B est phosphorylée par la kinase cellulaire PRK-2 (Kim *et al.*, 2004). Comme NS5A, NS5B interagit avec VAP-A et VAP-B. Ces interactions sont nécessaires à la réplication virale (Hamamoto *et al.*, 2005) (Gao *et al.*, 2004).

2) Les modèles d'études de HCV

L'identification du génome de HCV a permis, depuis 1989, de commencer à établir des connaissances sur les fonctions et les caractéristiques des protéines virales, même si toutes les expériences étaient réalisées sur des échantillons de patients assez hétérogènes. L'avancement des travaux a été retardé pendant plusieurs années du fait de l'absence d'un système qui permette d'étudier le virus en culture cellulaire, notamment les différentes étapes de son cycle viral, son interaction avec le système immunitaire ainsi que les facteurs cellulaires nécessaires à son cycle viral. Les études *in vivo* sur des chimpanzés ont été arrêtées par les lois d'éthiques interdisant leur utilisation au laboratoire, ainsi que par le coût élevé. De ce fait il a fallu trouver des systèmes *in vitro* et *in vivo* dans lesquels HCV pouvait accomplir un cycle viral complet.

En 1999, il a été montré que des réplicons subgénomiques pouvaient se répliquer dans des hépatomes humains *in vitro* (Lohmann *et al.*, 1999). Ces progrès se sont poursuivis en 2003, avec l'invention des particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe de HCV, qui permettent d'étudier l'étape d'entrée virale *in vitro* (Bartosch *et al.*, 2003a). Ce n'est qu'en 2005 que le

premier système permettant l'étude d'un cycle viral complet *in vitro* a été publié (Wakita *et al.*, 2005).

a) Les modèles cellulaires

i) La culture d'hépatocytes primaires provenant de patients infectés

Les premières tentatives de culture « *in vitro* » de HCV, étaient de cultiver des hépatocytes de patients chroniquement infectés par HCV. Le virus se répliquait et une production virale était observée en culture cellulaire (Ito *et al.*, 1996). Des hépatocytes primaires humains ou de chimpanzés ont été infectés suite à une mise en contact avec des séras de patients infectés par HCV (Fournier *et al.*, 1998) (Lanford *et al.*, 1994) (Rumin *et al.*, 1999). Il a également été montré que des hépatocytes primaires peuvent produire des virions de différents génotypes par lesquels ils sont infectés (Buck, 2008). Les hépatocytes primaires simulent l'infection *in vivo* mais présentent des inconvénients majeurs : la difficulté de leur culture, la diversité de ces cellules ainsi que le niveau faible de production virale. D'autres lignées non-hépatiques peuvent être infectées mais leur niveau d'infection n'est pas suffisant pour produire des virions.

ii) Les réplicons génomiques de HCV

L'étape de réplication fait intervenir un grand nombre de facteurs cellulaires, détourne des mécanismes et des voies cellulaires à son profit. Le faible niveau de réplication dans les hépatocytes primaires n'est pas suffisant pour étudier ces mécanismes. Un réplicon viral est une entité capable de se répliquer dans une cellule cible d'une manière autonome. Ces ARN bicistroniques, encadrés par les extrémités 5' NC et 3' NC de HCV, contiennent un gène de sélection placé sous le contrôle de l'IRES HCV. La séquence codant les protéines virales de HCV est placée sous le contrôle de l'IRES EMCV (virus de l'encéphalomyocardite). Un réplicon sub-génomique contient la séquence la plus courte de HCV (NS3 à NS5B), représenté dans la figure 6 qui permet une réplication efficace : unité

minimale de réplication (Lohmann *et al.*, 1999) (Ikeda *et al.*, 2002) (Pietschmann *et al.*, 2002). Cependant, bien que le système des réplicons permette d'étudier l'étape de réplication, la présence des protéines structurales, surtout la protéine de capside, peut avoir plusieurs effets sur la réplication. Des mutations d'adaptation sont accumulées, permettant de maintenir un bon niveau de réplication (Blight, 2000) (Krieger *et al.*, 2001) (Lohmann *et al.*, 2001). Malgré les avancées qu'a offert ce système dans l'étude de la réplication de HCV, des inconvénients majeurs existent. L'accumulation de mutations d'adaptation peut altérer certaines propriétés des protéines virales, ainsi que la pression de sélection peut avoir un effet sur les cellule (Pietschmann *et al.*, 2001). Des cellules hépatiques hautement permissives ont pu être obtenue suite à l'élimination des réplicons HCV par l'IFN. Ces lignées cellulaires hépatiques qui dérivent de la lignée Huh-7 ont acquis des mutations d'adaptation en faisant un outil précieux d'étude de la réplication (Zhong *et al.*, 2005) (Friebe *et al.*, 2005) (Lindenbach *et al.*, 2006).

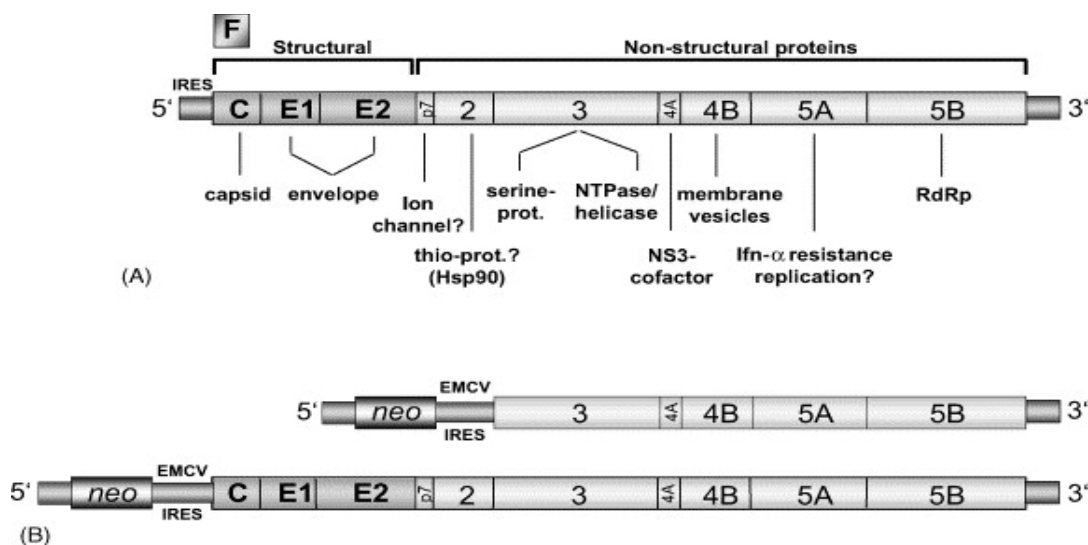


Figure 6 : Représentation schématique des réplicons de HCV.

Les réplicons sont constitués d'une séquence codant un marqueur de sélection (*neo* = neomycin phosphotransferase) placée sous le contrôle de l'IRES de HCV et d'une séquence codant les protéines de HCV placée sous le contrôle de l'IRES de l'EMCV, le tout encadré des régions 5'et 3'NC de HCV. Les réplicons sous-génomiques (en haut) portent la séquence codant les protéines NS3 à NS5B de HCV tandis que les réplicons génomiques (en bas) portent la séquence entière de la polyprotéine (Bartenschlager *et al.*, 2003).

iii) Les particules rétrovirales pseudotypées (HCVpp)

L'établissement des particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe de HCV est l'outil indispensable dans l'étude de l'étape d'entrée. En effet ce système, appelé HCVpp, a permis de combler partiellement l'absence de système de culture cellulaire (Bartosch *et al.*, 2003a) (Drummer *et al.*, 2003) (Hsu *et al.*, 2003).

La production de ces particules se fait par une co-transfection de 3 plasmides d'expression dans les cellules HEK-293T (*Human Embryonic Kidney*). Le premier plasmide exprime les glycoprotéines d'enveloppe E1E2, le deuxième plasmide exprime les protéines codées par les gènes *gag* et *pol* du virus MLV (*Murine Leukemia Virus*) ou HIV (*human immunodeficiency virus*) et le troisième exprime le gène rapporteur (luciférase ou GFP), inséré dans un génome rétroviral, qui permet de quantifier le niveau d'infection des HCVpp (figure 7). Les cellules HEK-293T sont capables de produire et sécréter les particules virales dans le surnageant de culture. Ce surnageant est capable de transduire des cellules d'une manière dépendante des glycoprotéines d'enveloppe E1E2 qui sont exprimées à la surface de ces particules rétrovirales. En parallèle, le génome rétroviral porteur du gène rapporteur est intégré dans le génome de la cellule, ce qui permet son expression.

Ce système permet d'étudier l'étape d'entrée bien que les particules rétrovirales pseudotypées avec E1E2 ne présentent pas les mêmes caractéristiques que les particules observées avec le système répliatif HCVcc (sera décrit ultérieurement), ni celles observées chez les patients. Ce système permet d'évaluer l'activité des anticorps neutralisants puisque l'expression de E1E2 confère aux HCVpp un tropisme envers les cellules hépatiques et spécialement celles permissives à HCV. La présence d'anticorps neutralisants contre HCV chez les patients, neutralise les particules rétrovirales E1, E2 (Bartosch *et al.*, 2003b) (Bartosch *et al.*, 2003a).

Ce système de particules est valable pour tous les génotypes de HCV présentant un bon outil d'étude de l'étape d'entrée.

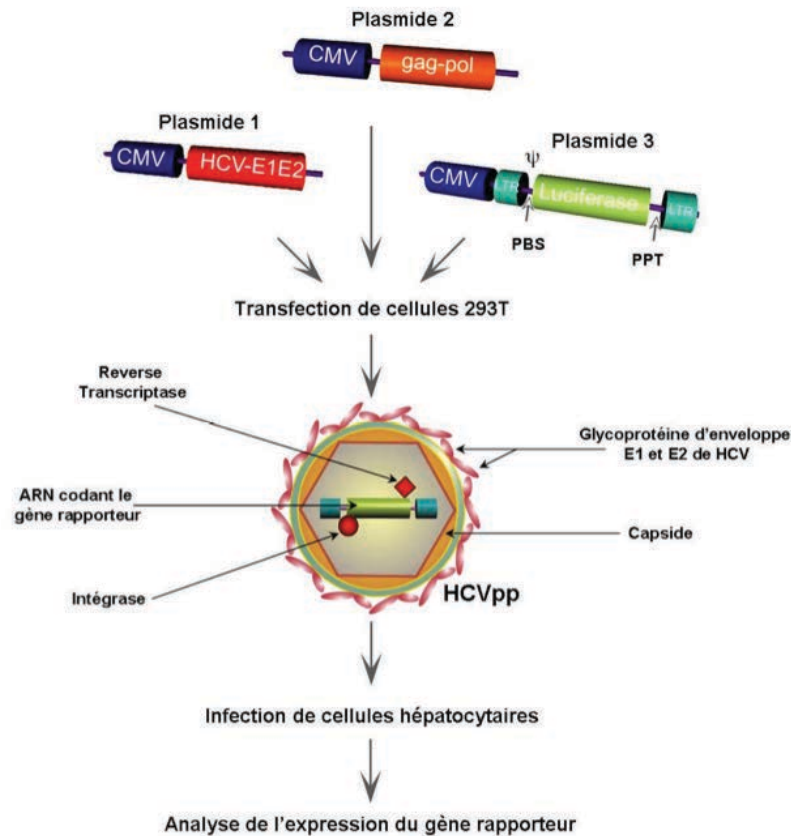


Figure 7 : Représentation schématique de la production des HCVpp. Les cellules HEK-293T sont transfectées avec trois vecteurs d'expression. Le premier code les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 de HCV. Le second exprime les protéines codées par les gènes gag et pol du MLV ou du VIH (Matrice, Capside, Nucléocapside, Protéase, Réverse-transcriptase et Intégrase). Le troisième exprime un génome rétroviral contenant un gène rapporteur (luciférase). Le génome rétroviral contient les séquences nécessaires à la réverse transcription et à l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN génomique de la cellule infectée (LTR, PBS, PPT). Les protéines de matrice, capside et nucléocapside permettent son encapsidation (grâce au signal d'encapsidation Ψ), l'assemblage de la particule et son bourgeonnement à la membrane plasmique. Les particules rétrovirales HCVpp, portant à leur surface les glycoprotéines E1 et E2, sont sécrétées dans le surnageant de culture. Elles sont utilisées pour infecter des cellules hépatocytaires. Les cellules infectées intègrent le gène rapporteur dans leur ADN génomique grâce aux reverse-transcriptase et intégrase. L'expression de ce gène rapporteur permet de quantifier l'infectedité des HCVpp. Tiré de (Voisset & Dubuisson, 2004)

iv) Le premier système productif en culture cellulaire (HCVcc)

Bien que le développement des systèmes réplicon et HCVpp a permis l'étude de 2 grandes étapes du cycle viral, l'absence d'un système productif de particules virales infectieuses en culture cellulaire a retardé la compréhension de plusieurs mécanismes et en particulier de l'étape d'assemblage. Ce n'est que 16 ans après l'identification de HCV, que ce système a été développé permettant d'étudier les étapes tardives du cycle viral (Wakita *et al.*, 2005) (Zhong *et al.*, 2005) (Lindenbach, 2005).

L'ARN viral a été isolé chez un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante avec un stade avancé de la pathologie. Le système réplicon de cette souche virale de génotype 2a, appelée JFH1, était capable de se répliquer dans les lignées Huh-7 sans mutation d'adaptation (Kato *et al.*, 2001) (Kato *et al.*, 2003). De ce fait, le but était de pouvoir rajouter la séquence codant les protéines structurales à la séquence du réplicon pour obtenir la totalité du génome de HCV. Pour cela, l'ADN complémentaire de l'ARN JFH1 a été placé sous le contrôle du promoteur T7 pour avoir une transcription et par conséquent un ARN JFH1 synthétisé *in vitro*. Cet ARN a été électroporé dans des cellules Huh-7 naïves. La réplication de l'ARN dans les cellules a conduit à la production et sécrétion de nouveaux virions infectieux dans le surnageant de culture (figure 8). La densité de ces particules sphériques de 55nm de diamètre, était comprise entre 1,15 et 1,17 g/ml (Wakita *et al.*, 2005). La même approche effectuée dans les clones Huh-7.5 et Huh-7.5.1 (identifiés pour un meilleur taux de réplication que la lignée parentale Huh-7) ont permis l'obtention de meilleurs titres infectieux (Lindenbach, 2005) (Zhong *et al.*, 2005). Les particules produites par ce système étaient capables d'infecter les lignées hépatiques, les hépatocytes primaires, les chimpanzés et les souris humanisées (Lindenbach *et al.*, 2006). Les hépatocytes primaires infectés par des HCVcc étaient capables de produire des particules virales infectieuses et qui ont été appelées HCVpc (*primary-culture-derived virus*) (Podevin *et al.*, 2010). Des améliorations du système HCVcc ont été réalisées depuis 2005. Il a été montré que par des re-infections successives, l'amplification du virus montre une

accumulation de mutations d'adaptation favorisant la propagation en culture cellulaire. Une fois introduite dans le cDNA de JFH1 ces mutations favorisent la production virale en culture cellulaire (Delgrange *et al.*, 2007). D'autres tentatives de production de particules ont été réalisées avec d'autres génotypes viraux. Les titres viraux étaient beaucoup plus faibles que ceux observés avec le JFH1 (Kato *et al.*, 2007) (Yi *et al.*, 2006). Pour contourner ce problème, des constructions chimériques ont été réalisées en couplant la séquence codant les protéines structurales des autres génotypes avec la séquence codant les protéines de NS3 à NS5B de JFH1 (Lindenbach, 2005) (Pietschmann *et al.*, 2006) (Gottwein *et al.*, 2009). Depuis la découverte des HCVcc, des constructions chimériques portant des gènes rapporteurs dont la *Renilla luciférase* ont été utilisées pour faciliter la quantification du niveau d'infection. Ces constructions répliquent avec un taux faible mais suffisant pour pouvoir détecter des variations de l'activité de la luciférase (Koutsoudakis *et al.*, 2006). En utilisant les HCVcc il a été montré que l'infection inhibe la permissivité de la cellule vis à vis d'une infection (Schaller *et al.*, 2007) (Tscherne *et al.*, 2007).

A l'heure actuelle le système HCVcc (JFH1 et ses dérivés) reste le premier outil capable de produire des particules infectieuses en culture cellulaire et avec lequel des avancées majeures dans la compréhension des étapes tardives du cycle ont été obtenues.

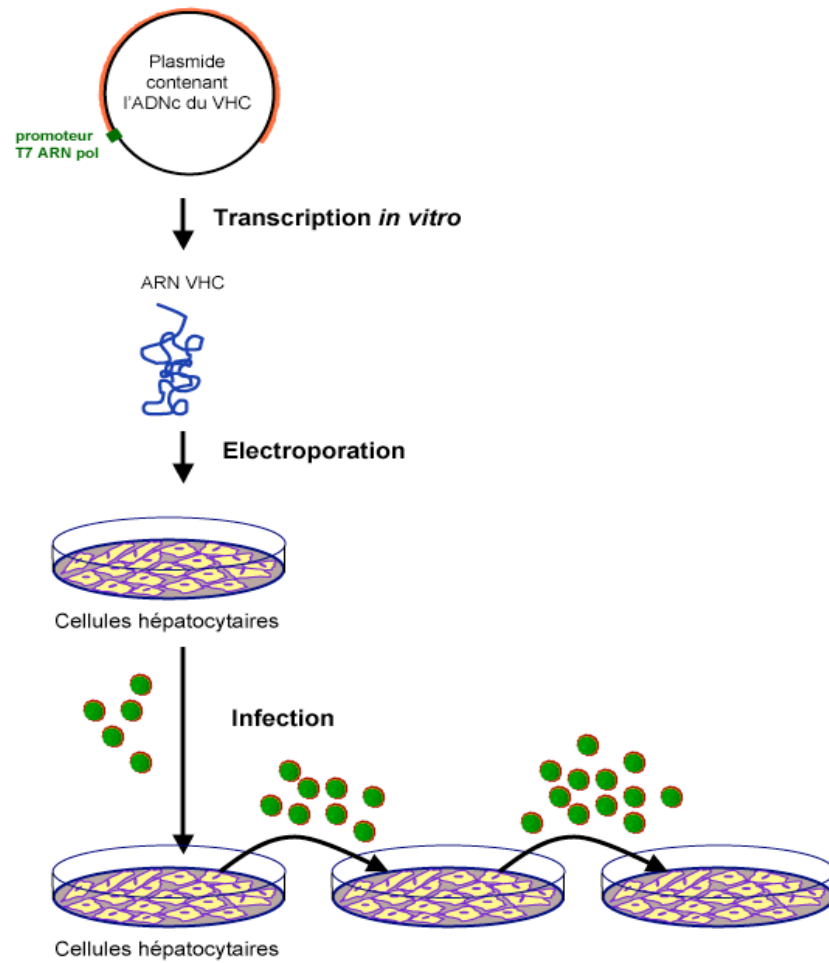


Figure 8 : Représentation schématique de la production des HCVcc.

L'ADN complémentaire (ADNc) du génome viral est transcrit *in vitro* à partir du promoteur T7. Les ARN viraux produits sont utilisés pour transfecter des cellules hépatocytaires naïves. Les cellules transfectées produisent des particules HCVcc qui sont utilisées pour infecter de nouvelles cellules hépatocytaires. Cette infection permet l'étude du cycle viral complet puisque les cellules infectées produisent de nouvelles particules virales. La réalisation d'infections successives permet d'amplifier le stock viral.

b) Les modèles animaux : les souris « humanisées »

Mis à part les hépatocytes humains, l'infection des hépatocytes du chimpanzé est d'une efficacité comparable. Des inconvénients majeurs, notamment éthiques, difficulté de manipulation, coût élevé et temps de gestation et reproduction difficiles, s'opposent à l'utilisation de chimpanzés comme animaux modèles pour l'étude de HCV. Il a fallu trouver un autre animal modèle ne présentant pas ces inconvénients et dont les hépatocytes sont permissifs à HCV.

Le tropisme de HCV est très restreint et son étape d'entrée nécessite la présence d'un nombre de récepteurs d'origine humaine pour se réaliser spécialement la tétraspanine CD81 et la protéine des jonctions serrées occludine (Ploss *et al.*, 2009). La réplication à son tour nécessite la présence d'un certain nombre de facteurs cellulaires humains pour se réaliser (McCaffrey, 2002). Une étude montre que l'adaptation des étapes d'entrée et de réplication dans les cellules murines est réalisable, contrairement à l'étape d'assemblage et de sécrétion qui ne peut pas se réaliser dans des cellules de souris (Ploss *et al.*, 2009) (Flint *et al.*, 2006) (Bitzegeio *et al.*, 2010).

L'autre approche est de remplacer le foie murin par des hépatocytes humains. Ce modèle consiste à détruire le foie murin des souris SCID (severe combined immunodeficiency) par un transgène activateur d'urokinase plasminogène (uPA) sous le contrôle du promoteur de l'albumine qui assure l'expression du transgène dans le foie. Une fois le foie de la souris est détruit, une xénogreffe aboutit à la recolonisation du foie par des hépatocytes humains (Mercer *et al.*, 2001) (Meuleman *et al.*, 2005) (Vanwolleghem *et al.*, 2010). D'autres modèles de souris humanisées immunodéficientes ont été décrits avec un taux de 95% de foie humain (Bissig *et al.*, 2010). L'infection des souris humanisées est réalisable avec un bon taux de réussite, cependant le problème majeur qui vient se poser est l'immunodéficiences de ces animaux. En effet aucune donnée sur la réponse immunitaire ne peut être observée. En plus le taux d'installation de la xénogreffe est variable d'un animal à l'autre. Elles offrent par contre une bonne voie pour étudier l'effet des antiviraux dans un contexte *in-vivo* (Ploss & Rice, 2009).

Ultérieurement des modèles de souris humanisées immunocompétentes ont été décrits dans le but de tester des stratégies vaccinales, mais aucune production

virale n'est observée. Le modèle le plus intéressant est celui des souris greffées par des souches hématopoétiques et des cellules progénitrices hépatocytaires. Le foie est colonisé par des cellules hépatiques humaines et une réponse immunitaire est mise en place (uniquement réponse cellulaire). Ces souris peuvent être infectées par des sèras de patients et manifestent des signes cliniques de l'hépatite, mais sans production virale. Malgré l'absence de la réponse humorale chez ces souris elles présentent le modèle animal le plus développé pour l'instant qui permet d'évaluer la réponse immunitaire chez des souris humanisées (Washburn *et al.*, 2011).

3) Le cycle viral de HCV

Le cycle viral de HCV est un cycle assez complexe puisqu'il fait intervenir plusieurs facteurs viraux et cellulaires d'une manière séquentielle afin d'aboutir à la production de virions par une cellule. D'une manière synthétique, le cycle a été divisé en 3 grandes étapes (figure 9) : l'étape d'entrée qui fait intervenir un nombre de récepteurs du virus exposés à la surface des cellules et qui participent au tropisme du virus. Cette étape libère l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule hôte. Cet ARN est aussitôt traduit pour former la polyprotéine HCV qui sera clivée par des protéases virales et cellulaires, ce qui permet d'initier l'étape de réplication de l'ARN. Afin de former ces virions cet ARN suit la voie de maturation des VLDL, va être encapsidé puis sécrété par la cellule infectée.

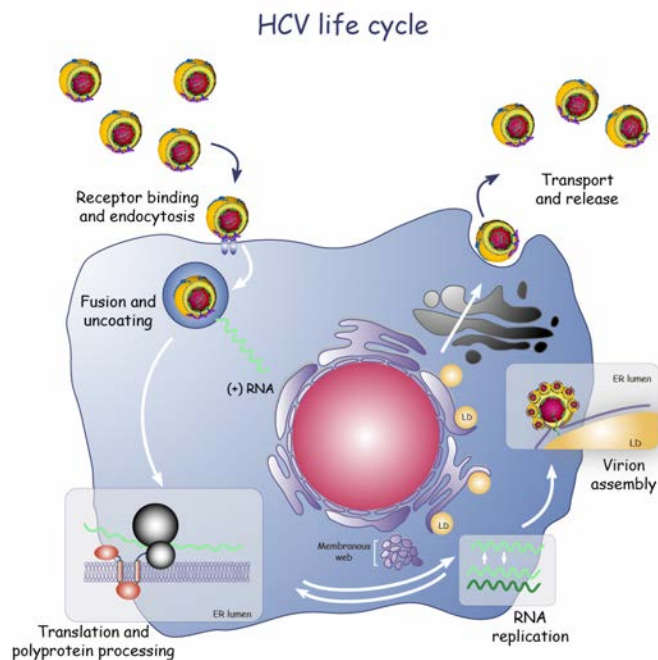


Figure 9 : Cycle infectieux de HCV.

1) Le virus se lie à la surface des cellules sur ses récepteurs spécifiques puis est internalisé par une voie d'endocytose dépendante de la clathrine. 2) L'enveloppe virale fusionne avec la membrane endosomale, libérant l'ARN génomique dans le cytoplasme. 3) Le génome viral est traduit au niveau du RE. 4) Le génome viral est également utilisé pour la synthèse de brins négatifs qui serviront de matrice pour la production de nouveaux ARN génomiques de polarité positive. 5) Les protéines de structure servent à l'encapsidation des nouveaux ARN génomiques et à l'assemblage de nouvelles particules virales. 6) Les nouveaux virions suivent la voie de sécrétion jusqu'à leur export hors de la cellule. Adapté de (Popescu & Dubuisson, 2010)

a) Les facteurs d'attachement

Les facteurs d'attachement de HCV sont les lectines, les glycoaminoglycanes (GAGs) et le récepteur de LDL (*LDL-R*).

i) Les lectines

Les lectines DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) et les L-SIGN (*liver/lymph node-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) interagissent avec des formes recombinantes de E2 ou avec les HCVpp (Lozach *et al.*, 2004) (Lozach *et al.*, 2003). En revanche, il a été montré que ces lectines ne permettent pas l'entrée des HCVpp ni des HCVcc, écartant l'idée que ces lectines soient des récepteurs spécifiques de HCV (Lai *et al.*, 2006). Par ailleurs elles ne sont pas exprimées à la surface des hépatocytes. Les DC-SIGN sont exprimées à la surface des cellules dendritiques, tandis que les L-SIGN sont à la surface de l'endothélium des capillaires sinusoides du foie. Une hypothèse concernant la fonction de ces lectines serait que L-SIGN contribue à concentrer le virus dans le foie.

ii) Les Glycosaminoglycanes (GAGs)

Les GAGs de type héparanes sulfates sont présents à la surface des hépatocytes et participent à l'attachement de HCV. Il a été montré que l'héparine, un homologue des héparanes sulfates, ou un traitement des cellules par de l'héparinase étaient capables d'inhiber l'attachement de HCV (HCVpp, HCVcc ou HCV isolés des sera de patients) (Barth, 2003) (Barth *et al.*, 2006) (Basu *et al.*, 2007) (Morikawa *et al.*, 2007). Les glycosaminoglycanes facilitent l'attachement des HCVcc à la surface de la cellule hôte d'une manière spécifique, puisque l'affinité des héparanes sulfates des lignées hépatiques humaines à HCV est élevée (Koutsoudakis *et al.*, 2006) (Barth, 2003). Récemment une interaction entre l'héparine et les glycoprotéines d'enveloppe des particules infectieuses intra et extracellulaire de HCV a été

identifiée (Vieyres *et al.*, 2010), indiquant la spécificité des GAGs dans la reconnaissance de HCV.

iii) Le récepteur des LDL (LDL-R)

Les particules de HCV circulent en association à des lipoprotéines sous forme de LVP dans les séra des patients infectés (Andre *et al.*, 2002). Les apolipoprotéines associées aux LVP sont généralement ApoB et ApoE. Elles interagissent avec le LDL-R exprimé à la surface des cellules hépatiques et participent au métabolisme lipidique. Le LDL-R est impliqué dans l'infection HCV (Agnello *et al.*, 1999), probablement en attachant les LVP (Germi *et al.*, 2002) (Martin *et al.*, 2008) (Molina *et al.*, 2007) (Owen *et al.*, 2009), mais a aussi un rôle post-entrée sur l'infection HCV (Albecka *et al.*, 2012).

Ces résultats ont été obtenus avec des anticorps dirigés contre les LDL, VLDL, LDL-R, ApoB et ApoE qui bloquent l'entrée de HCV; ainsi que des siRNA dirigés contre le LDL-R qui inhibent l'infection (Owen *et al.*, 2009) (Albecka *et al.*, 2012). Il a été montré aussi qu'une corrélation existe entre l'accumulation d'ARN viral et l'expression de LDL-R en surface ainsi que l'internalisation des LDL (Molina *et al.*, 2007).

Cependant ces résultats sont controversés ; en effet l'action d'une lipoprotéine lipase (hydrolyse les triglycérides des VLDL) favorise l'attachement au LDL-R mais inhibe l'infection (Andréo *et al.*, 2007). Une autre étude suggère que l'attachement du virus au LDL-R conduit à une voie non-productive (Albecka *et al.*, 2012). Par ailleurs un rôle du LDL-R a été suggéré sur une étape post-entrée à l'aide de si-RNA sans aucun effet sur l'attachement du virus en cas de déplétion de LDL-R (Jiang *et al.*, 2012).

b) Les facteurs d'entrée

i) La tétraspanine CD81

La tétraspanine CD81 a été le premier facteur d'entrée spécifique de HCV à avoir été identifié. CD81 est une petite protéine membranaire non-glycosylée à quatre

domaines transmembranaires. Elle est palmitoylée, très conservée et exprimée chez un grand nombre de cellules de mammifères. CD81 a été identifié comme facteur d'entrée à HCV suite à l'utilisation de la forme soluble de E2 avec laquelle elle interagit (Pileri, 1998). L'utilisation d'anticorps monoclonaux contre CD81 ou contre la boucle extracellulaire de CD81 (*LEL : large extracellular loop*) était capable de bloquer l'infection par les HCVpp et par les HCVcc (Bartosch *et al.*, 2003a) (Wakita *et al.*, 2005) (Lindenbach, 2005) (Kapadia *et al.*, 2007) (Cormier *et al.*, 2004). Ces observations ont été validées par interférence à l'ARN, puisque la déplétion de CD81 inhibe l'infection par les HCVpp et les HCVcc (Zhang *et al.*, 2004) (Akazawa *et al.*, 2007). L'expression ectopique de CD81 par les cellules HepG2, initialement non-permissives pour l'infection HCV, les rend permissives. (Cormier *et al.*, 2004) (Lindenbach, 2005). L'étape d'entrée de HCV fait intervenir de manière séquentielle plusieurs récepteurs, dont CD81 qui agit probablement après les facteurs d'attachement décrits précédemment (Koutsoudakis *et al.*, 2006).

ii) La protéine SRBI

SRBI est une protéine hautement glycosylée, exprimée dans le foie. Elle est composée de 2 domaines TM et 2 courtes queues cytoplasmiques et 1 large boucle extracellulaire (Rhainds & Brissette, 2003). Comme CD81, l'identification de la protéine SR-BI (*scavenger receptor class B type I*) a été réalisée en utilisant la forme soluble de la glycoprotéine E2 (Scarselli *et al.*, 2002). L'incubation des cellules avec des anticorps anti-SRBI, ou la déplétion de SRBI par des si-RNA inhibe l'infection des HCVpp et des HCVcc (Bartosch *et al.*, 2003c) (Kapadia *et al.*, 2007) (Lavillette *et al.*, 2005b) (Zeisel *et al.*, 2007). Il semble que SRBI régule 2 processus indépendants pendant l'étape d'entrée de HCV : Le premier grâce à sa fonction de récepteurs de lipoprotéines capable de lier les HDL, LDL et VLDL (les 2 dernières sont des composants des LVP) (Zeisel *et al.*, 2007); le deuxième serait son rôle régulateur du transfert lipidique. Ce deuxième rôle conditionne l'activité de SRBI dans le transfert lipidique. (Dreux *et al.*, 2009). Tout comme CD81, SRBI semble agir après l'attachement des LVP et ceci en coopération avec CD81 (Zeisel *et al.*, 2007). Les 2 fonctions de SRBI ont été vérifiées par des mutants qui

abolissent l'attachement des LVP mais gardent la capacité de SRBI à lier les HDL (Catanese *et al.*, 2010). En plus de son rôle dans l'infection, SRBI est important dans le mécanisme de transmission cellule à cellule de HCV (Meuleman *et al.*, 2012).

iii) La claudine 1

La claudine 1 (*CLDN-1*) est une protéine transmembranaire constitutive des jonctions serrées (*TJ: tight junctions*). Les TJ participent à l'étanchéité des épithéliums et au contrôle de la diffusion sélective entre les 2 membranes. (Tsukita *et al.*, 2001). La famille des claudines compte 24 membres dans les cellules de mammifères (Lal-Nag & Morin, 2008). Ce nouveau facteur a été identifié en utilisant une banque de cDNA de cellules hépatiques humaines. L'expression ectopique de cette protéine dans des cellules non-hépatiques HEK-293T, en plus de l'expression des récepteurs CD81 et SRBI, rend ces cellules permissives à l'infection par HCVpp et par HCVcc (Evans *et al.*, 2007). Bien que claudine 6 et 9 ne sont pas exprimées dans les cellules hépatiques permissives à HCV, leur expression en plus des facteurs d'entrée décrits précédemment CD81 et SRBI rend également les cellules HEK-293T permissives à HCV (Meertens *et al.*, 2008). La surexpression de CLDN-1 n'a pas d'effet sur l'infection HCV, par contre sa déplétion par si-RNA inhibe fortement l'infection dans les cellules Huh 7.5 (Evans *et al.*, 2007). La présence de CLDN-1 est nécessaire dans les lignées d'hépatocytes primaires puisque des anticorps anti-CLDN1 bloquent l'infection HCV (Fofana *et al.*, 2010) (Krieger *et al.*, 2010). Bien que la claudine 1 soit exprimée dans les zones de contact cellule-cellule (dans les cellules permissives à HCV) et dans les zones de jonctions serrées (dans les hépatocytes polarisés) son rôle dans l'entrée peut intervenir après une migration des complexes formés par les LVP et les récepteurs précédemment décrits (Brazzoli *et al.*, 2008). Il semble que CLDN-1 coopère avec CD81 et SRBI mais est impliquée après CD81 dans le processus séquentiel d'entrée de HCV (Evans *et al.*, 2007). Les anticorps anti-CLDN-1 inhibent l'interaction entre CLDN-1 et CD81 et par conséquent leur interaction avec la glycoprotéine E2. Ceci est à l'origine de l'inhibition de l'infection HCV (Krieger *et al.*, 2010).

iv) L'occludine

Une autre protéine des jonctions serrées, l'occludine, a été identifiée par l'expression d'une banque de cDNA comme facteur nécessaire à l'entrée de HCV (Ploss *et al.*, 2009). L'expression simultanée de CD81, SRBI, CLDN-1 et occludine dans des cellules murines NIH3T3 les rend permissives à l'infection par HCV. La déplétion par si-RNA de l'occludine bloque l'infection par HCVpp et HCVcc (Liu *et al.*, 2009a). Comme CLDN-1, elle interviendrait suite à la migration des complexes formés par les LVP et les récepteurs CD81 et SRBI. L'occludine intervient également dans le processus de transmission de cellule à cellule de HCV (Ploss *et al.*, 2009) (Brimacombe *et al.*, 2010).

v) La scramblase 1

La scramblase (*Sc1*) est une protéine membranaire qui régule les mouvements des lipides en présence de Ca^{2+} . Grâce à un screening double hybride réalisé chez la levure pour trouver des protéines qui interagissent avec E1 et E2, Sc1 a été identifiée. La déplétion de Sc1 par des si-RNA diminue l'infection des HCVpp et HCVcc. Sc1 est nécessaire à l'attachement des particules virales et pourrait avoir un rôle au cours de l'étape d'endocytose dépendante de la clathrine (voie d'endocytose de HCV) (Gong *et al.*, 2011).

vi) Les récepteurs tyrosine kinase (RTK)

Les récepteurs tyrosine kinase se sont avérés nécessaires à l'infection HCV (Lupberger *et al.*, 2011). Plus précisément, l'inhibition de EGF-R et de EphA2 par si-RNA diminue l'infection des HCVpp et HCVcc sans aucun effet sur la capacité des cellules à fixer E2 soluble. L'activation du signal par ces 2 récepteurs par leurs ligands spécifiques augmente l'infection HCV. Des inhibiteurs spécifiques des RTK, utilisés en clinique contre ces 2 récepteurs dans le traitement du cancer (erlotinib pour EGF-R et dasatinib pour EphA2) inhibent l'infection des HCVpp et HCVcc. Ces inhibiteurs réduisent l'infection par les HCVpp et par les particules

isolées de sera de patients dans le hépatocytes primaires. L'inhibition peut être réalisée après que le virus soit attaché aux cellules indiquant que ces RTK interviennent dans une étape tardive de l'entrée de HCV. Ils interviennent aussi dans la transmission cellule à cellule de HCV (Lupberger *et al.*, 2011). D'autre part la protéine G HRas a été décrite comme facteur clé pour l'entrée de HCV. En effet elle régule l'interaction du complexe CD81-CLDN1 en réponse à EGF-R. Cette liaison active une voie de transduction du signal qui est nécessaire à l'entrée de HCV (Zona *et al.*, 2013).

vii) Le récepteur NPC1L1

NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-like 1*) est un récepteur impliqué dans le transport du cholestérol. La déplétion par si-RNA de NPC1L1 ou l'utilisation d'anticorps anti-NPC1L1 inhibe l'entrée de HCVcc pendant une étape post-attachement des particules virales. L'ezetinib, un inhibiteur de NPC1L1 utilisé dans le traitement de l'hypercholestérolémie, inhibe l'infection par HCV. Ce traitement réalisé chez des souris humanisées retarde voire bloque l'infection dans quelques cas. NPC1L1 agirait au niveau de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de l'endosome (Sainz *et al.*, 2012).

c) L'internalisation et la fusion des LVP

Afin d'élucider le mécanisme par lequel les LVP de HCV pénètrent dans la cellule et libèrent leur matériel génétique, des inhibiteurs de l'acidification des endosomes (bafilomycine A1, concanamycine A ou du NH₄Cl) ont été utilisés. L'entrée de HCV a été inhibée en présence de ces inhibiteurs, ce qui suggère qu'elle est dépendante du pH (Blanchard *et al.*, 2006) (Meertens *et al.*, 2006). Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de la voie de clathrine, ou par déplétion de la clathrine, il a été montré que l'endocytose de HCV est dépendante de la clathrine (Blanchard *et al.*, 2006) (Meertens *et al.*, 2006).

L'utilisation des dominants négatifs de la protéine Rab5, impliquée dans le transport vers les endosomes précoces, suggère que HCV fusionne avec les endosomes précoces. Aucun effet n'a été observé en présence des dominants

négatifs de Rab7, un marqueur des endosomes tardifs (Meertens *et al.*, 2006). Il a été montré que suite à l'endocytose, HCV emprunte le trafic intracellulaire des microtubules (Roohvand *et al.*, 2009).

Suite au transport des particules HCV vers les endosomes précoces, la fusion avec les membranes des endosomes a lieu. En effet un pH acide induit un changement conformationnel irréversible pour un grand nombre de virus enveloppés, tandis qu'un traitement des particules HCV (HCVpp et HCVcc) montre qu'elles sont insensibles au pH acide, suggérant que leur sensibilité au pH acide est probablement due à un changement conformationnel pendant l'étape de post-attachement (Meertens *et al.*, 2006) (Tscherne *et al.*, 2006). La résistance des particules au traitement pH peut être due aux liaisons covalentes entre les glycoprotéines d'enveloppes (Vieyres *et al.*, 2010). Il a été montré en utilisant des liposomes que la fusion est dépendante de la température (Lavillette, 2006), qu'elle est facilitée par le cholestérol (Haid *et al.*, 2009). Une région de E1 (270-284) et 2 régions de E2 (416-430 ; 600-620) sont nécessaires au mécanisme de fusion (Lavillette *et al.*, 2007). Des mutations des domaines transmembranaires de E1, et de E2 altèrent la fusion des particules (Ciczora *et al.*, 2007).

d) La traduction de l'ARN HCV

Suite à la fusion et la décapsidation, l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte. Cet ARN de polarité positive sert d'ARNm qui est aussitôt traduit par la machinerie cellulaire. L'IRES présent dans l'extrémité 5'NC de HCV initie la traduction (Wang *et al.*, 1993). La sous-unité 40S ribosomale se fixe au codon d'initiation AUG suivi du facteur d'initiation de la traduction eIF3 (*eukaryotic Initiation Factor 3*), méthionyl-ARN de transfert initiateur (Met-tRNA_i), eIF2 (*eukaryotic Initiation Factor 2*) et le GTP. L'hydrolyse du GTP favorise le recrutement de la sous-unité 60S (Otto & Puglisi, 2004) (Ji *et al.*, 2004). Une fois le complexe formé, la traduction commence (Hoffman & Liu, 2011). Le peptide signal de la protéine E1 néoformée, dirige la protéine vers la membrane du RE, expliquant l'association étroite de l'étape de traduction aux membranes du RE. La polyprotéine de HCV de 3000 a.a. environ est ensuite clivée par des protéases cellulaires et virales pour générer les protéines structurales et non-structurales

de HCV (figure 10). Des protéases virales et cellulaires catalysent les clivages co- et post-traductionnels de la polyprotéine. Les clivages entre core/E1, E1/E2, E2/p7 et p7/NS2 sont réalisés par des peptidases signal et peptidases de peptides signal cellulaires. Le domaine protéase de NS2 effectue l'autoclavage NS2/NS3. L'activité sérine protéase de NS3 couplée au cofacteur NS4A clive NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A et NS5A/5B. Ainsi à l'état mature, les protéines non-structurales de HCV peuvent induire la formation des complexes nécessaires à la réplication de l'ARN.

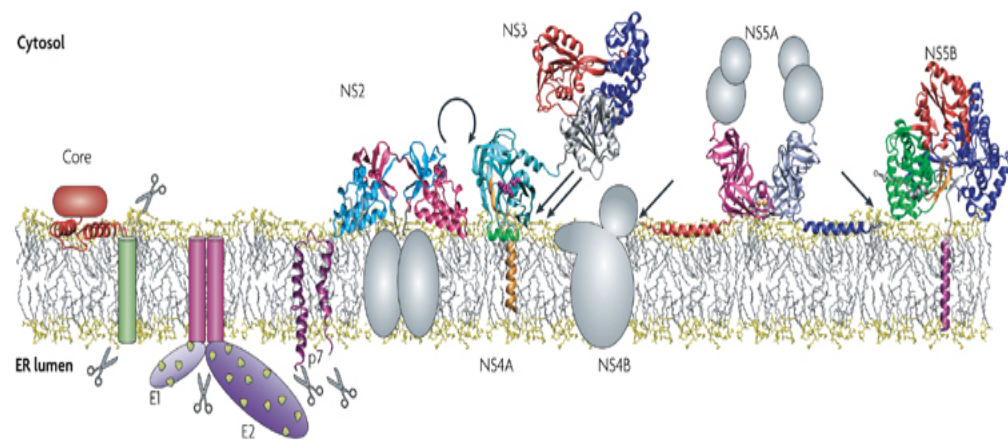


Figure 10 : Les protéines de HCV et leur association avec la membrane du RE.

Les ciseaux (✂) indiquent les clivages par les peptidase de peptide signal (côté cytosolique) et signal peptidase du RE (côté luminal). La flèche cyclique (↻) montre le clivage par la protéase NS2/3. Les autres flèches (↘) indiquent les clivages par le complexe NS3/NS4A. Les structures connues des différentes protéines sont représentées à la même échelle que la bicouche lipidique. Les structures non-déterminées sont représentées par des sphères et des cylindres colorés avec leurs tailles approximatives (Moradpour et al., 2007).

e) La réplication de l'ARN viral

Suite à l'expression des protéines virales, plusieurs facteurs cellulaires sont recrutés pour commencer l'étape de réplication de l'ARN HCV, qui est une étape cruciale du cycle viral. Les mécanismes régulateurs de la transition entre la traduction et la réplication sont peu connus. Il semble que les régions 5'NC et 3'NC de l'ARN participent à cette régulation (Ali & Siddiqui, 1997) (Chang & Luo, 2006) (Ito & Lai, 1999) (Domitrovich *et al.*, 2005) (Zhang *et al.*, 2002). Les complexes de réplication de HCV sont constitués par l'ARN viral, l'unité minimale de réplication : les protéines de NS3 à NS5B ainsi que de facteurs cellulaires régulateurs de cette étape. L'expression de la polyprotéine HCV dans une lignée cellulaire non-permissive U-2 OS (pas de réplication active dans ces cellules), a permis de voir des remaniements membranaires, qui semblent être les membranes nécessaires à la réplication de l'ARN (Egger *et al.*, 2002). Ces mêmes altérations membranaires péri-nucléaires ont été observées dans des cellules qui expriment un réplicon HCV et l'ARN néosynthétisé a été détecté au niveau de ses structures; ces remaniements membranaires ont été appelés « *membranous webs* » (Gosert *et al.*, 2003) (Moradpour *et al.*, 2003). Ces mêmes structures ont été observées dans des cellules infectées par des HCVcc (Rouillé *et al.*, 2006). En utilisant une protéine GFP fusionnée à NS5A dans le cadre d'un système réplicon, il a été montré que des réplicases plus petites et mobiles existent (Wölk *et al.* 2008). Ces structures semblent être les vésicules qui deviennent des « *membranous webs* ».

i) Régulation de la réplication

Il a déjà été décrit précédemment que comme pour la majorité des virus à ARN de polarité positive, l'ARN viral porte plusieurs fonctions. Dans un premier temps, pendant l'étape de traduction, cet ARN code les protéines virales ; ensuite, l'association de plusieurs facteurs viraux et cellulaires aboutissent à l'initiation de la réplication de cet ARN : l'ARN sert de matrice pour la synthèse du brin

négatif complémentaire qui sert d'intermédiaire pour la synthèse de l'ARN positif qui sera encapsidé dans les nouveaux virions (Targett-Adams *et al.*, 2008). Le passage de la traduction à la réplication est un phénomène mal connu. Dans des cellules exprimant un réplicon subgénomique de HCV, la quantité de protéines HCV est 1000 fois plus élevée que celle des molécules d'ARN, suggérant ainsi que la traduction est plus fréquente que la réplication (Quinkert *et al.*, 2005). Plusieurs protéines cellulaires interviennent dans cette régulation en interagissant avec les extrémités 5'NC et 3'NC. La protéine PTB « *polypyrimidine-tract-binding protein* » interagit avec les extrémités 5'NC, 3'NC et avec la partie C-terminale de la séquence de l'ARN codant la protéine core. Il a été décrit que la liaison de PTB avec la séquence de core inhibe la traduction et que par contre la levée de l'inhibition ferait suite à l'interaction de PTB avec l'extrémité 3'NC de l'ARN (Ito & Lai, 1999). Par cette dernière interaction, PTB régule aussi l'étape de réplication (Chang & Luo, 2006) (Domitrovich *et al.*, 2005). Une autre protéine cellulaire appelée « La » interagit avec les 2 régions NC de l'ARN et régule ainsi la traduction et la réplication (Ali & Siddiqui, 1997) (Domitrovich *et al.*, 2005). En plus des protéines cellulaires qui interviennent dans ce phénomène, il a été suggéré que la protéine core interagit avec l'extrémité 5'NC et régule ainsi le passage de la traduction à la réplication (Zhang *et al.*, 2002). En plus de la régulation protéique de la réplication, des séquences intrinsèques à l'ARN régule cette étape par des séquences consensus et des structures secondaires surtout au niveau des extrémités NC. Il a été montré que les 125 premiers nucléotides constituent l'unité minimale de réplication mais l'intégralité de cette région 5'NC améliore l'efficacité (Friebe *et al.*, 2001). La régulation de la réplication fait intervenir aussi des micro-ARN cellulaires, notamment miR-122, qui est exprimé dans les hépatocytes humains et qui interagit au niveau de 2 séquences dans la région 5'NC de HCV (Jopling *et al.*, 2005) (Jopling *et al.*, 2008). Il a été montré que miR-122 était un régulateur positif de la traduction et activateur de la réplication (Henke *et al.*, 2008). D'autre part, l'inhibition de la machinerie cellulaire impliquée dans la formation des micro-ARN, DICER, inhibe l'infection HCV (Randall *et al.*, 2007). 3 structures en tige-boucle dans la région X-tail ainsi que la région poly(U/C) de la région 3'NC interagissent avec NS5A, les protéines cellulaires PTB et La ainsi qu'avec d'autres zones dans l'ARN viral (Yi & Lemon,

2003) (You & Rice, 2008) (figure 11). Cinq structures secondaires en tige-boucle au niveau de NS5B sont requises pour la réplication. Elles interagissent avec l'ARN viral au niveau de leur structure complémentaire. Des mutations même sens au niveau des régions qui ont une structure complémentaire abolissent la réplication de HCV (Friebe *et al.*, 2005) (Diviney *et al.*, 2008). L'interaction des protéines virales et cellulaires ainsi que l'hyperphosphorylation de NS5A régulent la réplication de HCV.

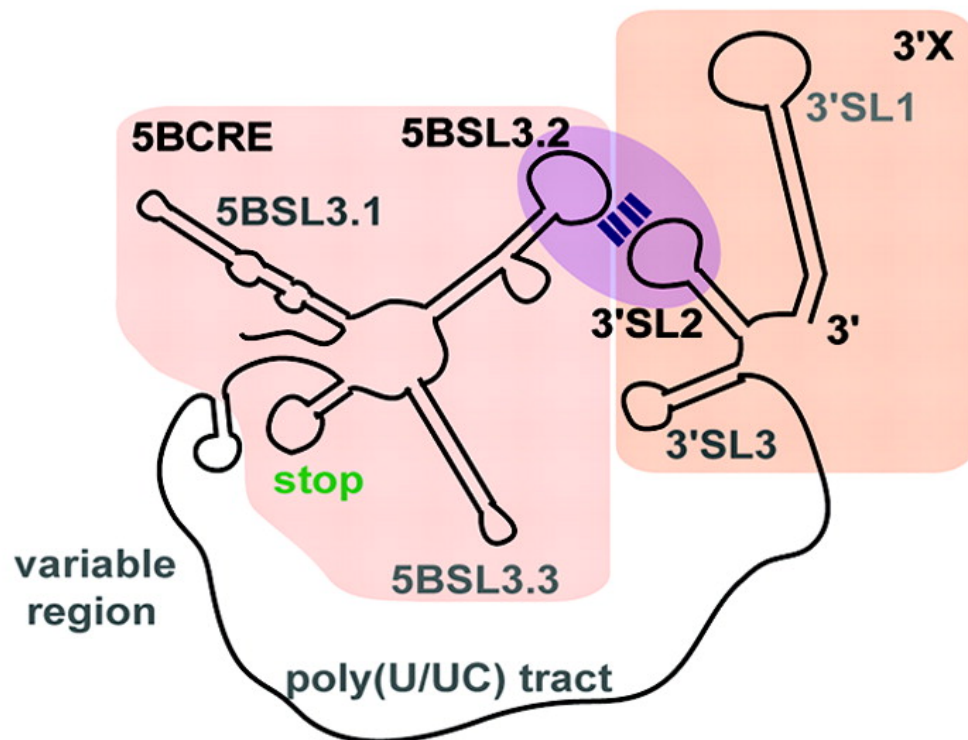


Figure 11 : schéma montrant l'interaction entre SL9266 (de la région codant NS5B) et la région 3' X-tail NC du génome de HCV (Tellinghuisen *et al.*, 2007).

ii) Rôle des protéines virales

La séquence de NS3 à NS5B flanquée des extrémités 5'NC et 3'NC a été décrite comme l'unité minimale de réplication (Lohmann *et al.*, 1999). Les 2 extrémités NC régulent la réplication par des mécanismes décrits précédemment. En plus de son activité protéase, NS3 participe par son activité hélicase dans le déroulement des structures secondaires de l'ARN, le déplacement des protéines qui interagissent avec l'ARN et la dissociation du brin néosynthétisé de sa matrice.

NS4A étant le cofacteur activateur de NS3, permet son ancrage à la membrane et par conséquent facilite son activité hélicase (Pang *et al.*, 2002).

NS4B est suffisante seule, pour induire la formation des altérations membranaires nécessaires à la réplication (Egger *et al.*, 2002). Il a été suggéré que NS4B coordonne la préparation de la machinerie nécessaire de la réplication en induisant les remaniements membranaires directement, ou en recrutant des facteurs cellulaires régulateurs de ce phénomène. Il a été montré que l'activité GTPase de NS4B est nécessaire à la réplication virale (Einav *et al.*, 2004).

NS5A possède des domaines de liaisons à l'ARN. La forme hyperphosphorylée de NS5A inhibe la réplication (Appel *et al.*, 2005). NS5A interagit d'autre part avec NS5B, l'ARN polymérase ARN dépendante. Par analogie avec d'autres polymérases de la même famille, NS5B synthétise un fragment ARN de polarité négative pour servir de matrice de synthèse des brins positifs porteur de l'information génétique dans les nouveaux virions.

iii) Rôle des protéines cellulaires

En plus de la propre régulation de la réplication virale par des structures de l'ARN de HCV et par les protéines virales, une régulation de la réplication se fait via une interaction directe ou indirecte avec des protéines cellulaires. La régulation par ces protéines peut se faire à plusieurs niveaux : Elles peuvent être activées par l'ARN viral ou l'expression des protéines de HCV notamment les protéines non-structurales qui forment le complexe de réplication. Toutefois, leur fonction peut être détournée par le virus à son profit.

Les protéines PTB et La ont été identifiées en tant que protéines interagissant avec l'ARN. Leur fonction a été décrite précédemment (Ali & Siddiqui, 1997) (Luo, 1999) (Domitrovich *et al.*, 2005). Des études d'interférence à l'ARN ont pu montrer que les protéines VAP-A et VAP-B sont nécessaires à la réplication, puisque VAP-A interagit avec la forme phosphorylée de NS5A qui est active pour la réplication. L'hyperphosphorylation inactive NS5A et la rend par conséquent incapable d'interagir avec VAP-A (Evans *et al.*, 2004) (Hamamoto *et al.*, 2005). VAP-A (*vesicle-associated membrane protein-associated protein A*) est une protéine associée aux vésicules intracellulaires. Elle régule le trafic membranaire et vésiculaire, la fusion, l'assemblage des complexes protéiques ; elle peut être associée au cytosquelette. Concernant la réplication de HCV, il semble que VAP-A recrute les protéines non-structurales nécessaires à la formation du complexe de réplication vers les radeaux lipidiques pour former les complexes de réplication (Gao *et al.*, 2004). De plus VAP-A et VAP-B régulent l'équilibre des lipides entre les membranes du RE et les autres membranes cellulaires notamment la membrane du Golgi (Peretti *et al.*, 2008). Il a été récemment montré (en absence d'infection HCV) que VAP-A, Arf1-GTP (sera décrite ultérieurement) et OSBP (*oxy-sterol binding protein*) participent ensemble dans l'échange du PI4P (*phosphatidylinositol-4-phosphate*) contre du cholestérol entre les membranes du RE et du TGN (*trans-Golgi network*) (Mesmin *et al.*, 2013).

La cyclophiline A est une PPIase (*peptidyl-prolyl cis-trans-isomérase*) qui interagit avec NS5B et semble être recrutée par NS5B aux complexes de réplication pour moduler leur forme et leur fonction. (Liu *et al.*, 2009b). Une étude analysant la structure des protéines a permis d'établir une interaction entre D2 de NS5A et les cyclophilines A et B. En effet les prolines du domaine D2 se comportent comme substrat pour l'activité enzymatique PPIase des cyclophilines A et B. (Hanouille *et al.*, 2009).

Cette protéine constitue une bonne cible thérapeutique, puisque des inhibiteurs de cette protéine sont en phase II d'étude clinique (Pawlotsky, 2014). Une autre immunophiline, FKBP8 (*FK506-binding protein*) interagit avec NS5A et la chaperonne Hsp90 (*heat shock protein*). L'inhibition de la fonction de FKBP8 ou sa déplétion par si-RNA diminue la réplication dans les systèmes réplicons HCV (Okamoto *et al.*, 2006). Il semble que ces 3 facteurs régulent la conformation des

protéines au sein des complexes de réplication.

La protéine FBL-2 par son domaine « *F-box* » régule l'association d'un complexe nécessaire à l'ubiquitination. Elle interagit avec NS5A grâce à son motif « *CAAX* ». Sa déplétion ainsi que l'utilisation des dominants négatifs inhibant l'activité de la « *F-box* », montre qu'elle est nécessaire à la réplication de HCV (Wang *et al.*, 2005).

La protéine PRK-2 régule la réplication en phosphorylant la polymérase virale NS5B (Kim *et al.*, 2004).

La protéine TBC1D20 (*TBC1 domain family, member 20*) est une protéine qui régule l'activation de la protéine Rab1 (*petite protéine G*) et par conséquent l'hydrolyse de la GTP en GDP. Dans un système de double-hybride de levure, cette protéine interagit avec NS5A. La déplétion de TBC1D20 diminue fortement l'infection HCV indiquant que cette protéine est nécessaire au cycle. Rab1 régule le transport entre le RE et le Golgi et pourrait de ce fait réguler les remaniements membranaires nécessaires pour HCV.

Le criblage par des banques génomiques d'ARN interférants, a montré que la phosphatidylinositol 4-kinase-III α (*PI4K-III α*) et COP-I (*coat protein 1*) étaient nécessaires à la réplication de HCV. Il a été montré que la PI4K-III α est indispensable pour la formation du MW (Li *et al.*, 2009) (Tai *et al.*, 2009), indiquant que cette fonction est nécessaire à la réplication de HCV (Berger *et al.*, 2009) (Trotard *et al.*, 2009) (Borawski *et al.*, 2009) (Vaillancourt *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'isoforme PI4K-III β a été montrée comme étant nécessaire à la réplication d'autres virus à ARN de polarité positive notamment les entérovirus (van der Schaar *et al.*, 2012) et nécessaire pour quelques génotypes de HCV (Trotard *et al.*, 2009) (Borawski *et al.*, 2009). Une étude similaire utilisant une banque de si-RNA ciblant différents facteurs de transport intracellulaire ont identifié les protéines EEA1 et Rab5A des endosomes précoces, Rab7L1 des endosomes tardifs et ont confirmé le rôle de la PI4K-III α dans la réplication de HCV. Rab5A, Rab7L1 et PI4K-III α sont des composants des complexes de réplication de HCV (Berger *et al.*, 2009).

L'utilisation de la bréfeldine A (BFA), un inhibiteur du trafic vésiculaire et membranaire dans la cellule, inhibe la réplication de HCV. Il a été montré que GBF1, un facteur d'échange nucléotidique, sensible à la BFA, est nécessaire à la

réplication de HCV. GBF1 régule la formation des transporteurs vésiculaires via l'activation des protéines G de la famille Arf (Goueslain *et al.*, 2010).

Suite à ce travail, la protéine Arf1 activée par GBF1, a été montrée comme étant aussi impliquée dans l'étape de réplication de HCV (Zhang *et al.*, 2002) (Matto *et al.*, 2010).

Il a été montré récemment que OSBP, un échangeur cholestérol / PI(4)P, est nécessaire à la réplication HCV. Son rôle précis n'est encore pas très bien connu. C'est un composant des complexes de réplication de HCV et il est indispensable à l'intégrité du MW (Wang *et al.*, 2014a).

Enfin, il a été montré récemment que ArfGAP1, protéine qui régule l'activité de Arf1 en hydrolysant la GTP en GDP, était nécessaire à la réplication de HCV en participant au maintien d'un environnement riche en PI4P (Li *et al.*, 2014).

iv) Structure et organisation du MW

La réplication des virus à ARN de polarité positive nécessite le plus souvent des remaniements membranaires au niveau de la cellule hôte qui sont le siège de la réplication. L'expression de la polyprotéine HCV dans des cellules non-permissives, induit des remaniements membranaires qui se sont avérés ultérieurement être morphologiquement très similaires aux complexes de réplication de HCV. Ces vésicules, d'une taille entre 80 et 180 nm de diamètre, forment un réseau qui a été décrit comme étant le MW (Egger *et al.*, 2002). Il a été montré aussi que l'expression de NS4B seule, était capable d'induire des remaniements semblables. Les mêmes structures ont été observées ultérieurement dans des réplicons HCV (Gosert *et al.*, 2003) et dans des cellules infectées par HCV (Rouillé *et al.*, 2006). Ces remaniements membranaires enveloppent et protègent les complexes de réplication. Il a été observé qu'après un traitement à la digitonine (détergent doux) la protection de l'ARN ainsi que la localisation de NS5A et NS5B étaient inchangées (Miyanari *et al.*, 2003). La protection des complexes dans les membranes permet des échanges tels que les NTP nécessaires à la synthèse d'ARN. Les membranes remaniées du MW dérivent du RE (Shi *et al.*, 2003). En effet la traduction de l'ARN HCV se fait au niveau du RE et l'expression des protéines de NS3 à NS5B permet de voir qu'elles se

localisent au niveau du RE (Moradpour *et al.*, 2003). Une autre étude suggère que ces membranes proviennent du Golgi (Aizaki *et al.*, 2004). La propriété de résistance aux détergents suggère que ces membranes sont enrichies en cholestérol et en sphingolipides, ce qui n'est pas le cas de la membrane de RE. Il a été montré que la réplication est en étroite relation avec le métabolisme lipidique. Une dérégulation de plusieurs gènes impliqués dans les voies métaboliques notamment l'induction de l'ATP citrate lyase aussi bien en système réplicon (Kapadia & Chisari, 2005) et dans une infection aigue chez les chimpanzés (Su *et al.*, 2002). Il est probable que HCV modifie la fluidité membranaire pour faciliter l'étape de réplication. Ces membranes sont hétérogènes ; une étude en microscopie électronique a montré qu'il existait des vésicules à double membrane (DMV) en plus des vésicules à simple membrane (SMV) dans les cellules hautement répliquatives (Huh-7.5) ou dans des cellules contenant un réplicon de génotype 1b (Ferraris *et al.*, 2010) (Ferraris *et al.*, 2013)(figure 12). Une autre étude montre que les DMV dans des cellules Huh-7 infectées étaient prédominantes par rapport aux SMV en proposant un modèle 3D des MW (figure 13) (Romero-Brey *et al.*, 2012).

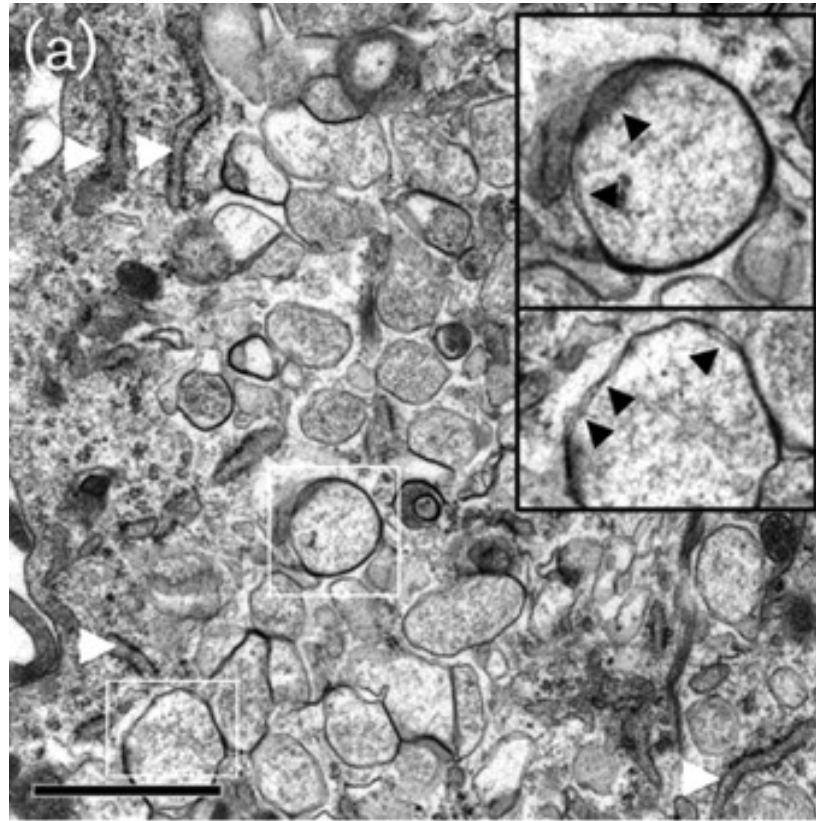


Figure 12 : Réarrangement membranaire montrant des vésicules à double membrane dans des cellules Huh-7.5 exprimant un réplicon sous-génomique de la souche JFH1 (Ferraris et al., 2010).

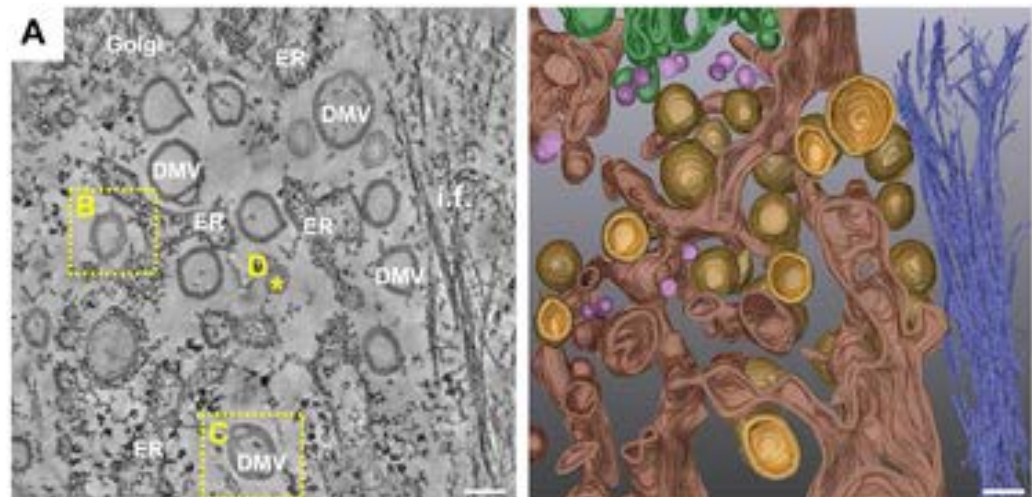


Figure 13 : Structure en 3D des réarrangements membranaires induits par la réplication de HCV 16h après infection. Des cellules Huh-7,5 ont été infectées avec la souche Jc1 et fixées 16h après infection. Une reconstitution des images en 3D montre la présence de nombreuses vésicules à double membrane (DMV). Le RE est coloré en marron foncé, la membrane interne des DMV est colorée en jaune foncé et la membrane externe en marron clair. Les vésicules à simple membrane sont colorées en rose. Les filaments intermédiaires sont colorés en bleu foncé et l'appareil de Golgi en vert (Romero-Brey et al., 2012).

f) Assemblage et sécrétion des particules

Bien que les systèmes HCVpp et réplicons aient permis l'étude des étapes d'entrée et de réplication avant la mise en place du système HCVcc, les étapes d'assemblage et de sécrétion n'ont pas pu être étudiées avant 2005. L'assemblage des particules HCV est en relation étroite avec la voie des VLDL. Le facteur qui déclenche l'assemblage des particules est mal connu. Il a été montré que la maturation de la protéine de capsid par clivage protéolytique induit son adressage vers les gouttelettes lipidiques (GL) péri-nucléaires, qui sont le lieu d'assemblage des particules (McLauchlan *et al.*, 2002) (figure 14).

2 hypothèses tentent d'expliquer le contact entre les GL et les complexes de réplication pour déclencher l'assemblage : la migration des complexes de réplication jusqu'au GL, via le réseau des microtubules, déclenche l'étape d'assemblage (Lai *et al.*, 2008). Une autre hypothèse serait la migration des GL vers les complexes de réplication via une interaction entre la protéine de capsid et le réseau des microtubules (Boulant *et al.*, 2008). Un rôle important semble être joué par NS5A, qui semble réguler l'initiation de l'assemblage des particules virales, par son domaine III (ce domaine contient un résidu sérine, dont la phosphorylation est essentielle à la production virale (Tellinghuisen *et al.*, 2008b) (Appel *et al.*, 2008), par son interaction avec la protéine de capsid (Masaki *et al.*, 2008) ou par son interaction avec les GL (Miyinari *et al.*, 2007). En plus de NS5A, NS3 joue un rôle essentiel pendant l'assemblage et la sécrétion. Elle est recrutée au niveau des GL pendant l'étape d'assemblage (Miyinari *et al.*, 2007) et participe à l'étape d'encapsidation de l'ARN néoformé (Ma *et al.*, 2008). Bien que NS2 ne soit pas requise pour l'étape de réplication, son rôle dans l'étape d'assemblage est crucial. Une mutation dans la séquence de NS2 bloque la production de particules virales sans influencer la mise en place de la machinerie notamment l'association de NS3, NS5A et la protéine de capsid avec les GL ; cette mutation n'influence ni l'oligomérisation de la protéine de capsid ni la formation des particules intracellulaires (Yi *et al.*, 2009). Il semble que NS2 joue un rôle de médiation entre le complexe formé au niveau des GL et les protéines structurales pour réguler l'assemblage (Yi *et al.*, 2009) (Popescu *et al.*, 2011a) (Ma *et al.*, 2011). La petite protéine p7 intervient pendant l'assemblage et de sécrétion

virale (Jones *et al.*, 2007) (Brohm *et al.*, 2009). Il semble qu'une interaction entre p7 et NS2 régule l'assemblage de HCV (Popescu *et al.*, 2011b).

En plus de la régulation par les protéines virales, l'assemblage et la sécrétion des particules fait intervenir la machinerie d'assemblage et de sécrétion des VLDL. L'intervention de la machinerie des VLDL participe à la formation des particules de faible densité (<1,14 g/ml), une propriété que les particules acquièrent pendant leur biogenèse (Gastaminza *et al.*, 2006). Cette interaction expliquerait la présence des LVP dans le sang des patients. Les LVP de faible densité constituent les particules les plus infectieuses. Il a été suggéré que l'apolipoprotéine B (ApoB) est nécessaire pour l'assemblage des particules infectieuses. La sécrétion semble être dépendante de la protéine microsomale de transfert MTP (Huang *et al.*, 2007) (Gastaminza *et al.*, 2008). D'autres études montrent que l'utilisation d'anticorps anti-ApoB, sa déplétion par si-RNA ou des inhibiteurs chimiques n'affecte pas la production virale. Ces études suggèrent plutôt un rôle de l'apolipoprotéine E (ApoE) dans ce processus (Jiang & Luo, 2009) (Owen *et al.*, 2009).

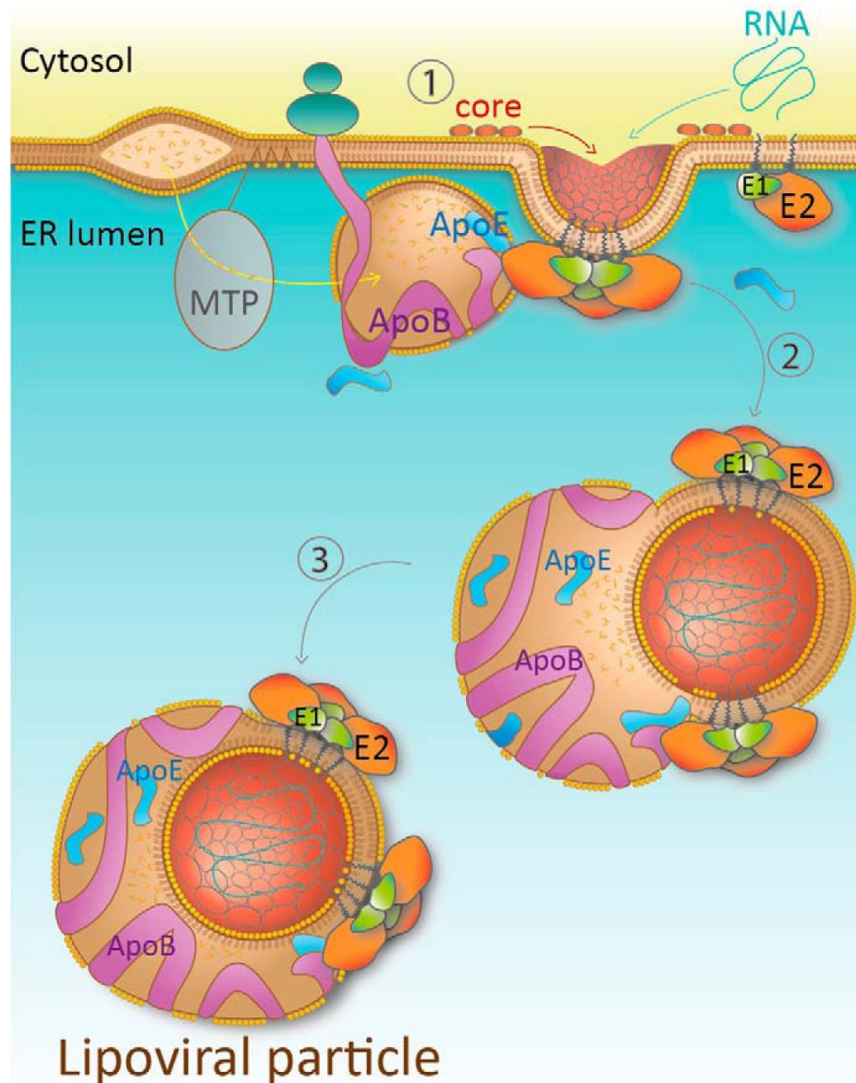


Figure 14 : modèle de morphogénèse des LVP de HCV. La première étape de ce processus est la lipodation d'un ApoB naissant, accompagné par la translocation simultanée d'une nucléocapside de HCV dans la lumière du RE. Ces deux précurseurs seront liés ensemble par l'association des glycoprotéines de HCV et des apolipoprotéines dans un complexe protéique. Les LVPs naissantes remplissent progressivement toutes les conditions appropriées de la voie de sécrétion, de fusion pour ensuite procéder comme une association physique entre un VLDL naissant et une particule virale du VHC (par l'intermédiaire d'un complexe protéique comportant ApoE, l'Apo B et les glycoprotéines) et un pH faible (étape 2). Au cours de leur progression le long de la voie de sécrétion, les LVP peuvent ou pas acquérir plus de triglycérides par fusion avec un lipide de la lumière du RE (étape 3), conduisant à la production d'une population de virus de densité hétérogène (Boyer et al., 2014).

C. Remaniements membranaires et réplication de HCV

La cellule eucaryote ainsi que les compartiments intracellulaires sont entourés par des membranes, formées d'une bicouche lipidique, qui les délimitent du milieu extérieur. Ces membranes-ci ne forment pas des barrières statiques et étanches, elles permettent le transport sélectif de molécules, protéines et lipides, entre différents compartiments de la cellule. Un grand nombre de molécules sont transportées à l'intérieur de vésicules. Ces vésicules bourgeonnent généralement à partir de la membrane du compartiment donneur et fusionnent avec la membrane du compartiment receveur.

1) Le transport vésiculaire dans la cellule

Plusieurs familles de protéines participent aux étapes du transport vésiculaire. Le bourgeonnement se fait au niveau de la membrane du compartiment donneur, qui se traduit par une association et un recrutement des protéines de manteau. Le complexe formé par les protéines de manteau crée une force qui participe à la courbure de la membrane et participe aussi au recrutement du cargo, l'élément crucial de la formation des vésicules (Aguilera-Romero *et al.*, 2008). Le bourgeonnement fait intervenir la synthèse de lipides particuliers qui permettent de courber la membrane (Asp *et al.*, 2009). D'autres protéines (à part les protéines du manteau) participent à la formation des vésicules dont les protéines SNARE (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*) qui sont impliquées dans des étapes ultérieures du transport.

Les protéines de manteau COP-I, COP-II et la clathrine constituent les protéines les mieux caractérisées pendant les événements de transport par vésicules (Kirchhausen, 2000) (figure 15). Les vésicules recouvertes de clathrine font intervenir des protéines de la famille des dynamines qui participent à leur fission. Elles seront ensuite transportées par le cytosquelette (Bashkirov *et al.*, 2008). Les protéines de manteau se détachent ensuite induisant la fusion avec la membrane de l'accepteur et la livraison du cargo transporté. (figure 16)

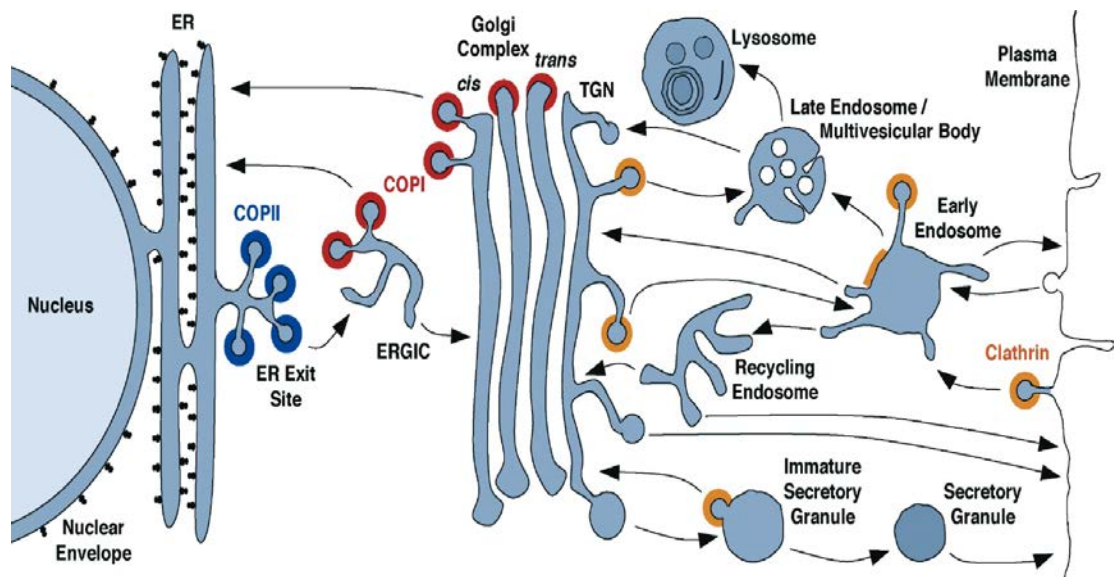


Figure 15 : Les différentes voies de transport intracellulaires
 Le schéma représente les compartiments de la voie de sécrétion, de la voie lysosome / vacuole, et de la voie d'endocytose. Les différentes étapes de transport sont indiquées par des flèches. Les couleurs indiquent les endroits connus ou présumés de formation de vésicules COPII (bleu), COPI (rouge), et de la clathrine (orange). Les manteaux de clathrine sont hétérogènes et contiennent différentes protéines adaptatrices et accessoires à différentes membranes (Bonifacino & Glick, 2004).

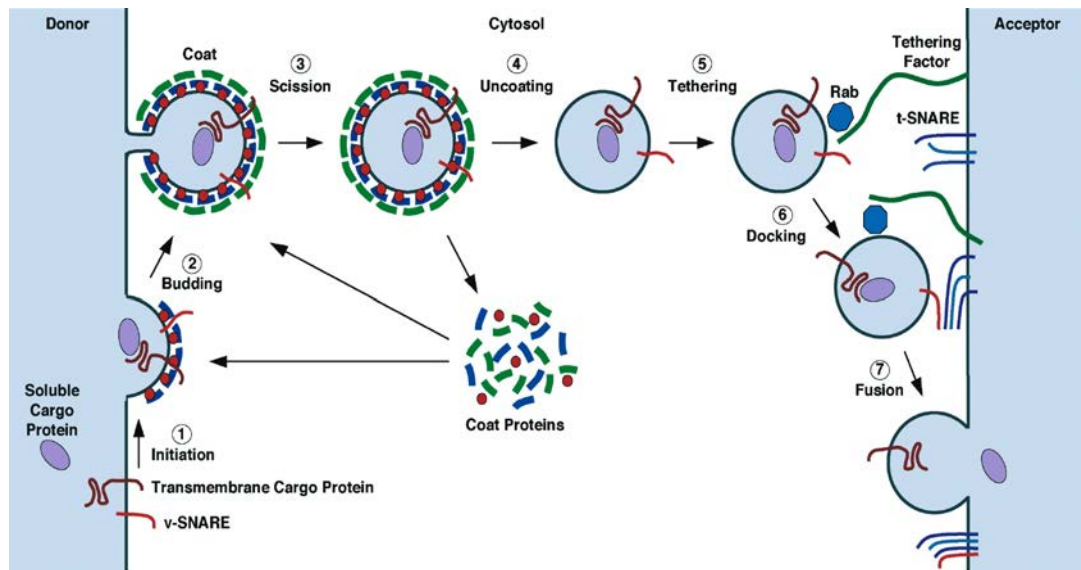


Figure 16 : Représentation schématique d'un événement de transport vésiculaire.

1-2-3 Les protéines de manteau (en bleu) sont recrutées au niveau de la membrane du compartiment donneur via des interactions protéiques (notamment avec les petites protéines G, en rouge) et lipidiques. Ce recrutement permet le bourgeonnement d'une vésicule mantelée puis son détachement. Le manteau est composé de protéines de manteau, de v-SNARE et probablement d'autres composants (en vert). **4** La vésicule est transportée vers le compartiment accepteur. Au cours de ce transport les protéines de manteau sont dissociées. **5-6-7** La reconnaissance réciproque entre la vésicule et la membrane du compartiment accepteur est assurée par différents facteurs (tethering factor et protéines G de la famille Rab notamment). La formation d'un complexe entre la v-SNARE présente sur la vésicule et les t-SNARE présentes sur la membrane du compartiment accepteur participe à la fusion (Bonifacino & Glick, 2004).

2) Rôle de la superfamille Ras dans l'événement de transport

Les petites protéines G de la superfamille Ras (Arf, Rab, Ran, Ras et Rho) régulent l'organisation spatiale et temporelle du transport membranaire dans la cellule en activant une série d'effecteurs cellulaires (Wennerberg *et al.*, 2005). En effet 2 sens de transport existent : le transport rétrograde et le transport antérograde. Si certains cargos sont transportés dans un sens, il existe aussi un transport de protéines et de lipides dans le sens inverse, qui permet de maintenir l'équilibre

dans la cellule. Les membres de la superfamille Ras sont associées aux membranes et présentent une localisation cellulaire indépendamment de leur activation. Elles sont maturées par des modifications co- ou post-traductionnelles qui permettent l'ajout d'un motif lipidique au niveau de leur extrémité N- ou C-terminale (à l'exception de la famille Ran) (Wennerberg *et al.*, 2005).

Ces petites protéines G existent sous 2 formes dans la cellule : la forme active qui lie le GTP et la forme inactive liée au GDP. Seule la forme active est capable de recruter les effecteurs. Les échanges entre les 2 formes nécessitent l'intervention de régulateurs spécifiques. Un facteur d'échange nucléotidique GEF catalyse l'incorporation du GTP par la forme inactive, qui sera capable de recruter les effecteurs. Les protéines de la famille GAP permettent l'hydrolyse du GTP et par conséquent le recyclage de la protéine G à l'état inactif en attendant un cycle suivant (figure 17). En prenant les protéines G de la famille Arf comme exemple, la forme active recrute différents types d'effecteurs : des protéines de manteau, des enzymes du métabolisme lipidique, des protéines régulatrices d'autres protéines G, des chaperonnes régulatrices du cytosquelette (tableau 3) (Donaldson & Jackson, 2011). Selon l'effecteur recruté par les protéines G, elles favorisent l'assemblage du manteau, la synthèse de lipides nécessaires au bourgeonnement. L'hydrolyse du GTP semble participer à la fission de la vésicule et à la dissociation des protéines du manteau. Nous allons détailler les protéines de la famille Arf puisqu'elles constituent l'intérêt de ce projet.

Tableau 3 : les effecteurs des Arf et des Arl (Donaldson & Jackson, 2011)

Effector	ARF	Location	ARF-interacting region
<i>Coat complexes</i>			
COPII	SAR1	ER exit sites	SEC23
COPI	ARF1,3	Golgi, ERGIC	γ -COP, β -COP
AP1-clathrin	ARF1,3	TGN, endosomes	γ -AP1, β -AP1
GGA1,2,3-clathrin	ARF1,3	TGN, endosomes	GAT domain
AP3	ARF1,3	Endosomes, TGN	–
AP4	ARF1,3	TGN	ϵ -AP4, μ -AP4 (also binds GDP-bound form)
BBSome	ARL6	PM	–
<i>Lipid-modifying enzymes</i>			
FAPP1,2	ARF1	Golgi	PH domain
CERT	ARF1	Golgi	PH domain
PtdIns4K	ARF1	Golgi	–
PtdIns4P5K	ARF1–6	PM (ARF6)	–
PLD	ARF1–6, ARL1	PM (ARF6)	–
<i>Tethers</i>			
GMAP210	ARF1	<i>cis</i> -Golgi	C-terminal GRAB domain
CC golgins*	ARL1	TGN	C-terminal GRIP domain
Exocyst	ARF6	PM	SEC10
GARP (VFT)	ARL1	TGN, endosome	–
<i>G protein regulators</i>			
ARHGAP21	ARF1,6	Golgi, PM	PH domain, C-terminal helix
Cytohesin (ARNO)	ARF6, ARL4	PM	PH domain
<i>Scaffolding proteins</i>			
JIP3,4	ARF6	Endosomes, intercellular bridge	LZII
FIP3,4	ARF5,6	Recycling endosomes, midbody	CC domain
<i>Tubulin folding chaperone</i>			
Cofactor D	ARL2	Cytosol	–
<i>Cargo</i>			
Rhodopsin	ARF4	TGN	VXPX targeting motif
<i>Other</i>			
NM23-H1	ARF6	PM, cell junctions	–
PDE δ	ARL2,3	Recruitment of prenylated proteins	β -sheet region
HRG4	ARL2,3	–	–
ARFAPTIN1,2	ARF1, ARL1	Golgi, TGN	BAR domain
SCOCO	ARL1	Golgi	CC
BART2	ARL2	Mitochondria, nucleus	α -helices 3, 4 and 5 of BART2

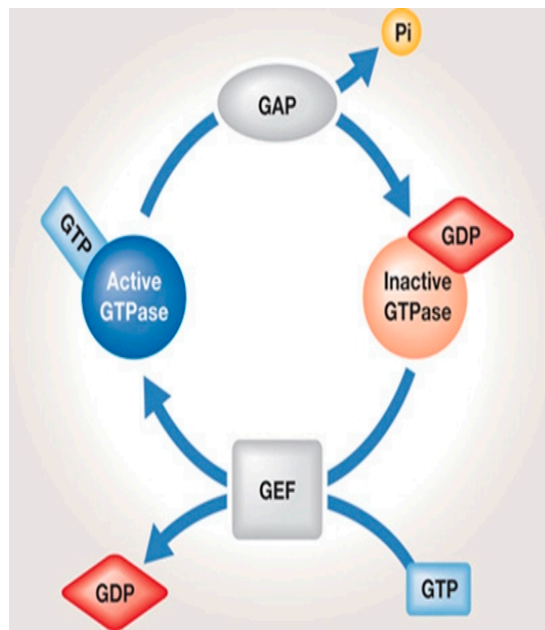


Figure 17 : Schéma du cycle d'activation / inactivation des petites protéines G
 Les petites protéines G de la superfamille Ras peuvent passer d'un état inactif lié au GDP à un état actif lié au GTP, et inversement. La réaction d'activation est facilitée par l'intervention de facteurs d'échange nucléotidique (GEF) tandis que la réaction d'inactivation est facilitée par l'intervention de facteurs d'activité GTPasique (GAP). L'état actif de la petite GTPase est capable de recruter différents effecteurs (Durán & Hall, 2012)

3) Les protéines G de la famille Arf

La famille Arf regroupe 6 protéines Arf, 2 protéines Sar, 14 Arl (*Arf-like proteins*) (Donaldson & Jackson, 2011) (Duijsings *et al.*, 2009). Ces protéines sont très conservées entre les espèces. Elles régulent des fonctions cellulaires diverses en régulant une série d'effecteurs. Elles sont impliquées dans des événements de transport au niveau des voies d'endocytose et de sécrétion, dans la régulation du métabolisme lipidique et dans la morphologie des compartiments cellulaires notamment le RE et le Golgi. Les 6 protéines Arf peuvent être divisées en 3 classes par homologie de séquences à l'échelle protéique. La classe I : Arf1, Arf2 et Arf3 ; la classe II : Arf4 et Arf5 ; la classe III : Arf6. Toutes ces protéines sont présentes dans les cellules de mammifères, à l'exception de Arf2 qui n'est pas exprimée dans les cellules humaines. La protéine Arf6 est la moins conservée avec seulement 66% d'identité de séquence avec les autres protéines Arf (Gillingham & Munro, 2007). Les protéines Arf de la classe I sont les plus exprimées. Elles régulent le transport au niveau de la voie de sécrétion, notamment dans le transport rétrograde du Golgi au RE et dans le Golgi même. Une redondance d'action a été décrite dans les fonctions cellulaires surtout entre les membres de la classe I (Volpicelli-Daley *et al.*, 2005). Ces fonctions sont

accomplies suite à l'activation d'effecteurs spécifiques par Arf1 ; Arf1 recrute et active les protéines du manteau COPI au niveau du cis-Golgi et agit en recrutant les adaptateurs de la clathrine : AP (*assembly protein*) et GGA (*Golgi-localised gamma-ear containing ARF binding protein*) au niveau du trans-Golgi (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). Les fonctions de Arf4 et Arf5 sont moins bien connues. Elles semblent être liées aux membranes sous forme GDP indépendamment de leur protéine GEF, contrairement aux Arf de la classe I (Duijsings *et al.*, 2009) (Donaldson & Jackson, 2011). Elles ont des fonctions qui ressemblent à celles de la classe I (Volpicelli-Daley *et al.*, 2005). La protéine Arf6 régule des événements de transport au niveau des endosomes et de la membrane plasmique. Cette protéine se localise dans la membrane plasmique, elle est liée aux membranes indépendamment de son niveau d'activation.

Les protéines Arf sont toutes myristoylées à leur extrémité N-terminale au niveau d'une hélice amphipathique. Grâce au groupement myristoyl, la protéine G se lie d'une manière rapide et réversible aux membranes des compartiments intracellulaires. La spécificité d'interaction avec la membrane dépend du facteur d'échange qui régule spécifiquement la protéine Arf (Franco *et al.*, 1996). L'incorporation du GTP par la protéine G change sa conformation et induit l'exposition de l'hélice N-terminale à l'extérieur de la protéine (initialement orientée à l'intérieur de la protéine) et l'ancrage de la protéine G dans la membrane (Pasqualato *et al.*, 2002). A l'exception de Arf6, les protéines Arf sont chargées négativement ou sont d'une charge neutre. Arf6 est chargée positivement ; cette caractéristique serait à l'origine de la stabilité de liaison de cette protéine avec les membranes. Les régions effectrices de l'échange nucléotidique sont composées de 2 domaines « *switch* » 1 et 2 séparés par un domaine « *interswitch* ». Pendant l'échange nucléotidique avec la protéine GEF, la protéine G change de conformation grâce à la zone effectrice, ce qui aboutit à l'exposition de l'hélice N-terminale à l'extérieur de la protéine et par conséquent faciliter la liaison à la membrane d'intérêt en recrutant la série d'effecteurs nécessaires (Pasqualato *et al.*, 2002) (figure 18).

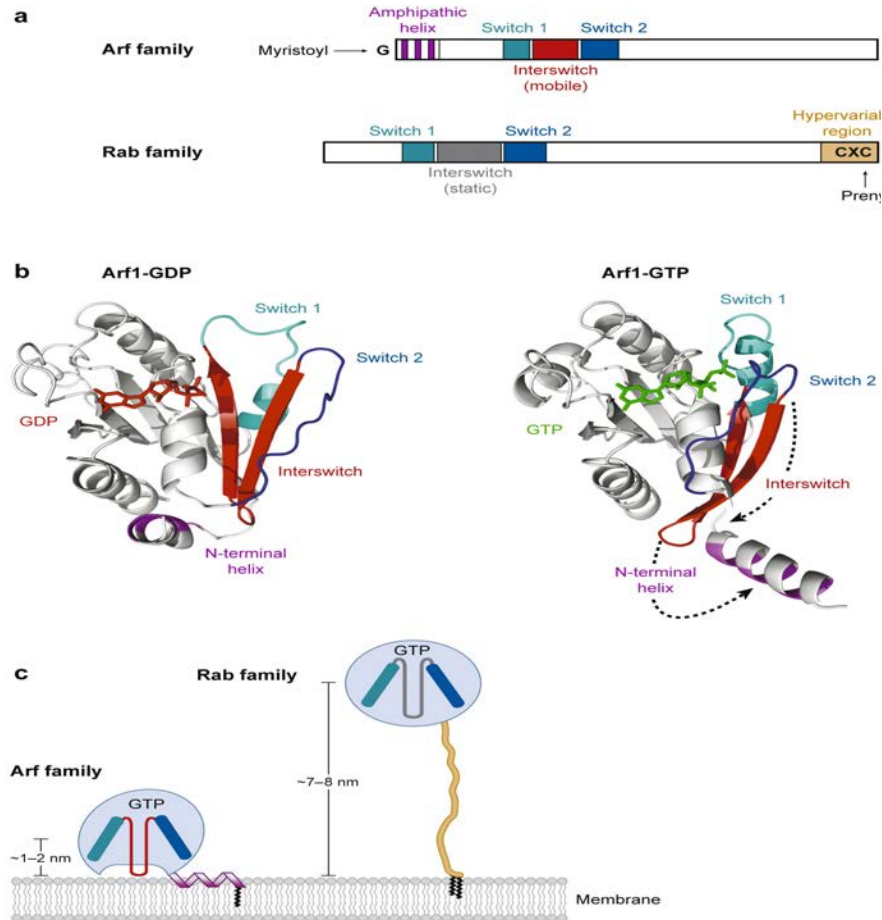


Figure 18 : Conformations de la protéine G ARF1.

a) Représentation schématisée d'une protéine G de la famille ARF. L'hélice amphipathique N-terminale responsable de l'ancrage membranaire et les régions switch I, switch II et interswitch responsables du changement conformationnel sont représentées. b) Structures de la protéine G ARF1 liée au GDP (à gauche) ou au GTP (à droite). La liaison du GTP provoque un mouvement de la région interswitch conduisant à l'exposition de l'hélice N-terminale (Gillingham & Munro, 2007).

Les Arf régulent un grand nombre de voies biologiques, notamment les protéines de manteau COPI; les adaptateurs de la clathrine AP1, AP3, AP4 et GGA ; les enzymes de modification des lipides : phospholipase D (PLD), phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K), phosphatidylinositol (4) phosphate 5-kinase (PIP5K) (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). Une série de ces divers effecteurs est présentée dans le tableau 3 (Donaldson & Jackson, 2011).

a) Echange nucléotidique par les GEF

Les facteurs d'échange nucléotidique GEF (*guanine-nucleotide exchange factor*) régulent les protéines G par échange du GDP en GTP. Cette régulation induit un changement de conformation au niveau de la protéine G, qui sera par conséquent capable de recruter ses effecteurs. Chez les mammifères 15 protéines ArfGEF ont été décrites, les mieux connues sont ARNO, BIG1, BIG2 et GBF1 (figure 19). Ces ArfGEF présentent un domaine catalytique, qui permet l'échange nucléotidique, conservé entre les espèces d'environ 200 a.a. appelé Sec7. Elles sont classées selon la taille de la protéine ; les ArfGEF de petite taille (ARNO) sont principalement localisées au niveau des endosomes et ne sont exprimées que chez les eucaryotes supérieurs. L'autre groupe contenant les ArfGEF de grande taille (GBF1, BIG1, BIG2) sont localisées au niveau du cis- et du trans-Golgi. Elles sont exprimées dans les cellules d'eucaryotes supérieurs mais possèdent aussi des orthologues chez la levure avec des séquences très conservées (Anders & Jürgens, 2008) (Jackson & Casanova, 2000). Les GEF sont spécifiques des membranes. Elles sont recrutées au niveau des membranes via des interactions protéiques ou lipidiques (GBF1, BIG1, BIG2) ou par un domaine PH (*pleckstrin homology*) qui se lie à la membrane via des phosphoinositides spécifiques (ARNO) (Jackson & Casanova, 2000). L'activité d'échange de nucléotide des ArfGEF se fait par le domaine conservé Sec7, qui possède une région hydrophobe qui permet l'interaction des domaines switch I et II des Arf. Cette interaction entre ArfGEF et Arf conditionne un échange favorable et par conséquent la liaison du GTP par Arf. Un résidu glutamate très conservé serait responsable par répulsion de charge de dissocier le GDP (Renault *et al.*, 2003). Une mutation de ce résidu rend GBF1 catalytiquement inactif et par conséquent inhibe sa fonction cellulaire (Niu *et al.*, 2005).

b) Hydrolyse de la forme Arf-GTP

L'hydrolyse du GTP permet le recyclage de la protéine G Arf et par conséquent son retour à l'état inactif couplée au GDP. Cette hydrolyse est très lente spontanément, et est stimulée par un facteur activant l'activité GTPase de Arf :

ArfGAP (*GTPase activating protein*). L'activité catalytique de l'ArfGAP est effectuée par un domaine d'environ 140 a.a. situé dans la partie N-terminale de la protéine. Dans les cellules humaines, 10 classes d'ArfGAP existent pour un total de 31 protéines (figure 20) (Kahn *et al.*, 2008). ArfGAP1 est recrutée au niveau des membranes qui forment les vésicules COPI, elle agit en augmentant la courbure de la membrane, dans le recrutement du cargo et dans la formation de ces vésicules (Antonny *et al.*, n.d.) (Pepperkok *et al.*, 2000). L'hydrolyse du GTP semble participer à la dissociation des protéines du manteau (Reinhard *et al.*, 2003) (Tanigawa *et al.*, 1993). Une redondance d'action est également présente entre les ArfGAP 1, 2 et 3. Les 2 dernières semblent être aussi des composants du manteau COPI (Saitoh *et al.*, 2009). Ces ArfGAP contiennent un résidu arginine et un motif en doigt de zinc qui sont très conservés. Ils forment une séquence caractéristique des membres de cette famille *Cys-X(2)-Cys-X(16-17)-Cys-X(2)-Cys* (Mandiyani *et al.*, 1999). Le motif en doigt de zinc maintient la structure de la protéine et l'arginine constitue un motif catalytique « *arginine finger* ». Les autres domaines coopèrent dans la fonction catalytique.

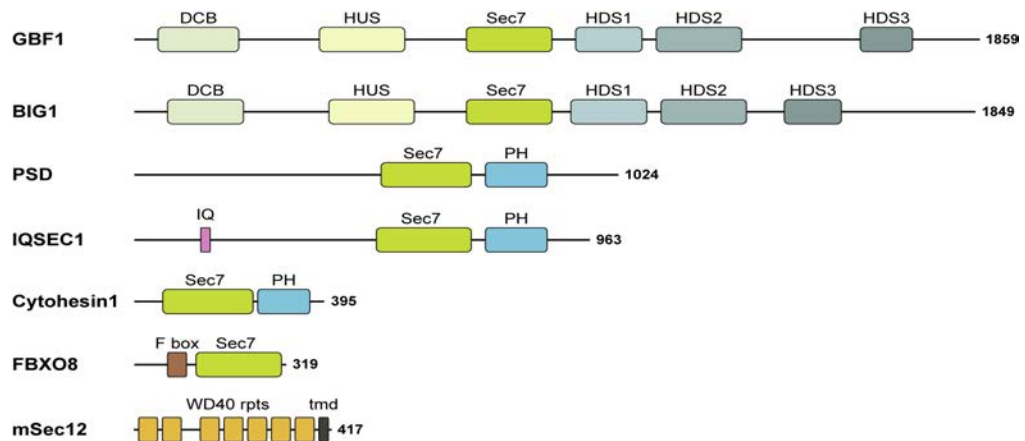


Figure 19 : Les facteurs d'échange nucléotidiques des protéines G ARF. Un membre de chaque famille est représenté. Les domaines caractéristiques identifiés sont annotés. DCB, dimerization and cyclophilin binding – HUS, homology upstream domain – HDS, homology downstream domain – PH, pleckstrin homology – IQ, IQ motif (Gillingham & Munro, 2007).

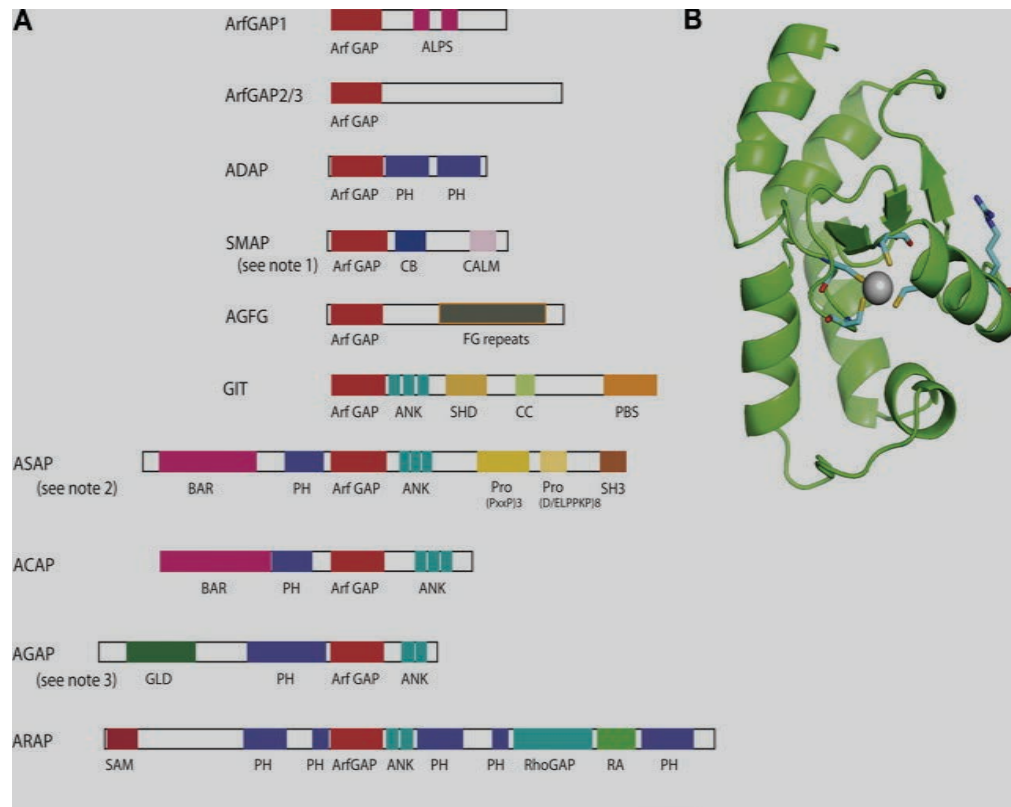


Figure 20 : Les protéines activatrices de l'activité GTPase des protéines ARF.

Un membre de chaque famille est représenté. Les domaines caractéristiques identifiés sont annotés.

A) ALPS, ArfGAP1 lipid-packing sensor; ArfGAP, ArfGAP domain; ANK, ankyrin repeat; BAR, Bin/Amphiphysin/Rvs; CALM, CALM binding domain; CB, clathrin-box; CC, coiled-coil; FG repeats, multiple copies of the XXFG motif; GLD, GTP-binding protein-like domain; PBS, Paxillin binding site; PH, pleckstrin homology domain; Pro(PxxP)3, cluster of three Proline-rich (PxxP) motifs; Pro(D/ELPPKP)8, eight tandem Proline-rich (D/ELPPKP) motifs; RA, Ras association motif; RhoGAP, RhoGAP domain; SAM, sterile α -motif; SH3, Src homology 3 domain; SHD, Spa-homology domain. (B) la structure d'un domaine isolé de ArfGAP1 (résidus 6-120) est schématisée dans cette figure montrant le squelette de la protéine. Les structures secondaires sont indiquées. Les résidus conservés (Arg50) ainsi que les 4 cystéines en doigts de Zn (Cys22, 25, 42, and 45) (Kahn et al., 2008)

c) Inhibition de la régulation des Arf

La compréhension des mécanismes successifs qui se déroulent pendant les étapes du transport vésiculaire a nécessité l'utilisation de plusieurs inhibiteurs chimiques qui bloquent chacun la voie à une étape donnée.

i) La bréfeldine A (BFA)

La bréfeldine A est une lactone hétérocyclique, produite par l'organisme *Eupenicillium brefeldianum*, qui est utilisée depuis plus de 20 ans pour inhiber la voie de sécrétion dans la cellule (Klausner *et al.*, 1992) (Misumi *et al.*, 1986). En plus de l'inhibition de la voie de sécrétion, la BFA inhibe plusieurs voies de transport notamment le transport entre les endosomes et les lysosomes (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1990). Une série de compartiments cellulaires sont sensibles au traitement par la BFA qui se manifeste par des changements de distribution de protéines et par conséquent un changement morphologique au niveau de ces compartiments. La BFA redistribue les protéines du cis-Golgi dans le RE ce qui se traduit par des vésicules golgiennes éparpillées dans la cellule (Klausner *et al.*, 1992). Les facteurs cellulaires sensibles à la BFA sont les ArfGEF de grande taille (GBF1, BIG1 et BIG2). Elle bloque le complexe formé par l'ArfGEF et la protéine Arf-GDP et le stabilise à l'état inactif au niveau de la membrane. Une fois séquestrée dans la membrane à l'état inactif, la protéine Arf ne peut plus recruter ses effecteurs notamment COPI ou AP1. Le blocage à ce niveau semble être la cause des changements morphologiques observés dans les compartiments cellulaires (figure 21) (Donaldson *et al.*, 1992). Parmi les Arf exprimées dans les cellules humaines, seule Arf6 n'est pas sensible à l'inhibition par la BFA. Le recrutement de COPI par Arf au niveau du cis-Golgi est médiée par GBF1 tandis que BIG1 et BIG2 régulent les Arf au niveau du trans-Golgi pour recruter respectivement les protéines AP (1, 3 et 4) et les protéines GGA (1, 2 et 3). Un effet protecteur contre l'inhibition par la BFA est observé suite à la surexpression de GBF1 ou de BIG2. Cette surexpression induit un phénotype de résistance au niveau du cis- (Claude *et al.*, 1999) (Niu *et al.*, 2005) et du trans-Golgi (Shinotsuka *et al.*, 2002). La BFA stabilise le complexe formé par la protéine G et le domaine Sec7 de l'ArfGEF. La mutation de plusieurs résidus dans la zone d'interaction avec la protéine G, rend ARNO sensible à la BFA (initialement résistante à la BFA). Ces résidus sont F190Y ; A191S ; S198D ; P208M (Robineau *et al.*, 2000). La tyrosine en position 190 semble être impliquée dans la liaison au groupement hydroxyle en position C7 de la BFA. Concernant la résistance de Arf6 à la BFA il semblerait

que des résidus présents en amont du domaine switch I et de l'interswitch limitent l'accès de la BFA (Zeeh *et al.*, 2006).

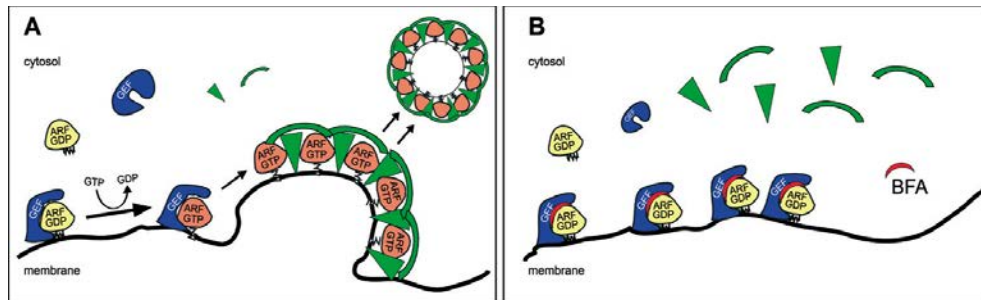


Figure 21 : Représentation schématique de l'inhibition des protéines ARF par la BFA

A) En absence de BFA, l'activation de la protéine G ARF, facilitée par le facteur d'échange nucléotidique (GEF) permet le recrutement des effecteurs nécessaires à la formation de vésicules (par exemple les protéines de manteau, en vert). B) En présence de BFA, il se forme un complexe ARF•GDP/GEF/BFA inactif (Anders & Jürgens, 2008).

ii) Le Golgicide A (GCA)

Le traitement de la cellule par la BFA se traduit par un blocage des 3 ArfGEF de grande taille. Un nouvel inhibiteur spécifique de la voie de sécrétion a été décrit en 2009 : le golgicide A. En effet, le golgicide A bloque les complexes formés par GBF1 et les protéines Arf, sans aucun effet sur les 2 autres ArfGEF de grande taille (BIG1 et BIG2). Les changements morphologiques au niveau du cis-Golgi sont comparables à ceux induits par la BFA, tandis que le GCA induit la dispersion des protéines du trans-Golgi contrairement à la BFA qui induit la formation de tubules au niveau du TGN. Le GCA interagit de manière similaire à la BFA (au niveau de la zone d'interaction de l'ArfGEF et de la protéine G) ; sa spécificité résulte de son interaction avec une boucle tripeptidique spécifique de GBF1. Le blocage par GCA montre un phénotype comparable au mutant de GBF1 qui est catalytiquement inactif et décrit précédemment (E794K) (Niu *et al.*, 2005) (Sáenz *et al.*, 2009).

iii) QS11

L'analyse d'une banque de petites molécules ciblant la voie Wnt/ β -caténine, impliquée dans un grand nombre de cancer dont le cancer colorectal, la molécule nommée QS11 montrait une bonne inhibition de cette voie. La recherche de la cible cellulaire de cette molécule a montré que ArfGAP1 était la cible spécifique de cette molécule (Zhang *et al.*, 2007b). L'inhibition de ArfGAP1 conduit au maintien des protéines G Arf sous forme active puisque le recyclage par ArfGAP1 est bloqué par QS11. Cette inhibition se traduit par un blocage plus tardif de la voie de sécrétion par rapport au blocage de la BFA. Le mécanisme par lequel l'inhibition se fait est encore mal connu.

4) La régulation de la voie de sécrétion par GBF1 et ArfGAP1

GBF1 est un facteur d'échange nucléotidique des protéines G de la famille Arf. Il est exprimé préférentiellement au niveau des membranes du cis-Golgi et de l'ERGIC avec également une répartition cytosolique. GBF1 active les protéines G Arf de classe I et II aux niveaux des membranes golgiennes, mais semble activer préférentiellement la protéine Arf5 *in vitro* (Claude *et al.*, 1999) (Kawamoto *et al.*, 2002). La régulation des protéines G Arf par GBF1 conduit au recrutement des effecteurs de ces Arf dont la protéine de manteau COPI qui forme les vésicules pendant le transport rétrograde. Il a été décrit que la mutation du résidu glutamate hautement conservé dans les domaines Sec7 des GEF inhibe l'échange catalytique. D'une manière intéressante la mutation E794K (non pas la E794D) inhibe cet échange nucléotidique et conduit à la dissociation du cis-Golgi dans les cellules NRK. Une autre mutation (M832L) au niveau de la zone impliquée dans l'interaction avec la BFA, inhibe cette interaction et confère, par conséquent, la résistance de GBF1 à la BFA (Niu *et al.*, 2005). L'inhibition de GBF1 par les inhibiteurs chimiques ou par si-RNA bloque le recrutement de COPI aux membranes et aboutit à la dissociation du cis-Golgi (Manolea *et al.*, 2008). L'association de GBF1 au Golgi est cyclique et très dynamique, cependant les mécanismes de recrutement membranaire des GEF, notamment GBF1, sont mal

connus. La protéine G, Rab1b, pourrait réguler le recrutement de GBF1 aux membranes golgiennes, par un mécanisme pas très connu pour le moment. Il semble qu'elle interagisse au niveau de la partie N-terminale de GBF1 (Monetta *et al.*, 2007). Une autre protéine cellulaire appelée uso1 ou p115, interagit avec la partie C-terminale de GBF1 et semble moduler la fonction de GBF1 et non pas son recrutement aux membranes. (García-Mata *et al.*, 2003). La surexpression de ce domaine impliqué dans la liaison avec p115 inhibe l'association de GBF1 avec les membranes du cis-Golgi. D'une manière séquentielle, le recrutement de GBF1 aux membranes du cis-Golgi favorise l'échange nucléotidique de la protéine Arf1 qui sera capable ensuite de recruter les protéines de manteau COPI afin d'initier le transport vésiculaire (Palmer *et al.*, 1993). En plus de Rab1b et p115, GBF1 interagit avec une série de facteurs nécessaires à son recrutement au niveau des membranes golgiennes. Quant à la protéine Arf1, elle interagit avec une série de protéines transmembranaires dont p23 et « membrin » qui semblent être nécessaires au recrutement de la forme inactive de cette protéine aux membranes (Gommel *et al.*, 2001) (Honda *et al.*, 2005). La forme active de Arf qui lie le GTP interagit avec les SNARE GS15, GS28 et YKT6 (Lee *et al.*, 2005). La protéine COPI reconnaît un motif lys-lys de la partie cytosolique C-terminale des protéines TM du RE et des protéines cargo p24 (Cosson & Letourneur, 1994). D'une manière séquentielle, le recrutement de GBF1 aux membranes régule l'échange nucléotidique de la protéine G qui lie le GTP et par conséquent recrute COPI aux membranes. Un autre modèle a été proposé, celui d'une interaction directe entre GBF1 et COPI indépendamment de Arf (Deng *et al.*, 2009) Il s'est avéré que le modèle anciennement proposé composé de GBF1/Arf1/COPI comme seuls régulateurs de la voie était incomplet (Orci *et al.*, 1993). De nombreuses protéines composantes ou non des vésicules régulent leur formation de ces vésicules. En plus de la protéine Arf-GTP et des protéines COPI, une étude a montré la présence de ArfGAP1 dans ces vésicules. En plus du rôle de ArfGAP1 dans la courbure nécessaire de la membrane (Antonny *et al.*, n.d.), l'hydrolyse du GTP par ArfGAP1 semble être impliqué dans la dissociation des protéines du manteau (Reinhard *et al.*, 2003). D'autres protéines participent à la dissociation des vésicules. Suite à son interaction avec une protéine ArfGAP1, la protéine BARS (*brefeldin A-dependent ADP-ribosylated substrate*) régule la fission des

vésicules COPI. Son interaction avec le palmitoyl-coenzyme A induit la fission tandis que l'interaction avec le NAD défavorise cette fission (Yang *et al.*, 2005). Il semble que la fission de ces vésicules est aussi dépendante de la synthèse de l'acide phosphatidique formé par la PLD2. (Yang *et al.*, 2008).

5) Inhibition de l'infection virale par la BFA

L'infection d'une cellule hôte par un virus engendre une utilisation, voire un détournement complet, de plusieurs mécanismes et voies cellulaires au profit de l'infection. L'inhibition de ces voies cellulaires engendre un blocage de l'infection par les virus qui utilisent ces voies. Du fait de son inhibition de plusieurs voies cellulaires, la BFA inhibe l'infection par plusieurs virus nécessitant le mécanisme de glycosylation (VSV : *vesicular stomatitis virus*) (Irurzun *et al.*, 1993), et la voie de sécrétion des protéines (HSV : *herpes simplex virus*) (Cheung *et al.*, 1991). La réplication des virus à ARN de polarité positive engendre des remaniements membranaires qui hébergent les complexes de réplication de ces virus. Ces membranes dérivent du RE dans la majorité des cas. La BFA inhibe l'infection par un grand nombre de virus à ARN de polarité positive (tableau 4).

Tableau 4. Virus à ARN de polarité positive sensibles à la BFA

virus inhibé par la BFA/GCA	famille / genre	Références
poliovirus	Picornaviridae/Enterovirus	(Maynell <i>et al.</i> , 1992)
GFLV (grapevine fanleaf virus)	Secoviridae/Nepovirus	(Ritzenthaler <i>et al.</i> , 2002)
MHV (mouse hepatitis virus)	Coronaviridae/Betacoronavirus	(Verheije <i>et al.</i> , 2008)
coxsackievirus B3	Picornaviridae/Enterovirus	(Lanke <i>et al.</i> , 2009)
HCV (hepatitis C virus)	Flaviviridae/Hepacivirus	(Goueslain <i>et al.</i> , 2010)
EV71 (enterovirus 71)	Picornaviridae/Enterovirus	(Wang <i>et al.</i> , 2014b)
dengue	Flaviviridae/Flavivirus	(Carpp <i>et al.</i> , 2014)

L'inhibition de l'infection de ces virus par la BFA suggère un lien étroit entre la voie de sécrétion inhibée par la BFA et la réplication virale.

6) Facteurs cellulaires sensibles à la BFA et nécessaires à la réplication virale

L'inhibition de la réplication virale par la BFA peut résulter du blocage d'un facteur cellulaire nécessaire au virus par la BFA. L'inhibition spécifique de ces facteurs composant de la voie de sécrétion a permis d'identifier une série de facteurs cellulaires indispensables à la réplication virale.

Le poliovirus (PV) est un virus non-enveloppé à ARN de polarité positive. L'infection par PV induit des réarrangements membranaires qui dérivent du RE et du Golgi (Bienz *et al.*, 1990). Ces vésicules périnucléaires semblent être les sites de réplication de l'ARN viral (Bienz *et al.*, 1992). Il a été montré que la réplication par le PV était sensible à l'inhibition par la BFA et que les protéines G Arf sont relocalisées vers les complexes de réplication. L'expression de la protéine 3A recrute GBF1 à ces membranes, tandis que l'expression de 3CD recrute les 2 autres ArfGEF sensibles à la BFA : BIG1 et BIG2. (Belov *et al.*, 2008). Un autre virus du genre des entérovirus, le coxsakievirus B3 (CVB3) montre une réplication sensible à la BFA. GBF1 s'est avéré comme facteur cellulaire inhibé par la BFA et nécessaire à la réplication de CVB3 (Lanke *et al.*, 2009). Une surexpression de la forme sauvage de GBF1 ou de la forme résistante à la BFA (M832L) montre une restauration partielle de l'infection par ces 2 virus en présence de BFA ; tandis que la surexpression de la forme catalytiquement inactive (E794K) ne restaure pas l'infection dans les mêmes conditions. La surexpression d'une forme de Arf1 (Q71L) constitutivement activée ne montre aucune restauration de l'infection par PV. Récemment il a été montré que le seul domaine N-terminal de GBF1 (710 a.a.) dépourvu du domaine catalytique sec7 était capable de restaurer l'infection PV en présence de BFA (Belov *et al.*, 2010). La déplétion de GBF1 par des si-RNA inhibe la réplication de ces 2 virus confirmant ainsi que l'inhibition de la réplication par la BFA résulte du blocage de GBF1. Cependant la BFA n'inhibe pas la formation des remaniements membranaires nécessaires à la réplication mais semble bloquer leur maturation. Ces structures immatures ne sont pas fonctionnelles (Belov *et al.*, 2008). Il semble que dans le cas du PV, la BFA n'affecte pas la localisation de la protéine virale 3A mais bloque la redistribution des protéines G Arf vers les sites de

réplication. Ces résultats suggèrent que les ArfGEF participent au fonctionnement de ces complexes de réplication (Belov *et al.*, 2008).

Le virus de l'hépatite murine (MHV *murine hepatitis virus*) est un coronavirus à ARN de polarité positive. Sa réplication engendre des remaniements membranaires qui sont le siège de la réplication virale. La réplication de MHV est sensible à l'inhibition par la BFA. La surexpression de la forme dominant-négatif de la protéine Arf1 (T31N) inhibe la réplication de ce virus suggérant ainsi que la forme activée des Arf est nécessaire à la réplication virale. La déplétion de GBF1 par des si-RNA indique que ce facteur est nécessaire à la réplication de ce virus (Verheije *et al.*, 2008). Toutefois, comme pour le poliovirus, la BFA ou la déplétion de GBF1 n'inhibe pas la formation de ces complexes de réplication suggérant un rôle de GBF1 et de Arf1 dans la maturation ou le fonctionnement de ces membranes (Verheije *et al.*, 2008).

La réplication de HCV est aussi sensible à l'inhibition par la BFA. Sa déplétion inhibe l'infection HCV ; la surexpression de GBF1 restaure partiellement l'infection en présence de BFA. GBF1 a été décrit comme le facteur cellulaire sensible à la BFA et nécessaire à la réplication virale. A l'heure actuelle aucune interaction de GBF1 n'a été observée avec les protéines virales de HCV. Il n'est pas composant des complexes de réplication de HCV. Comme pour les virus décrit précédemment, la BFA ou la déplétion de GBF1 n'altère pas la formation des remaniements membranaires nécessaires à la réplication mais semble agir dans leur maturation (Goueslain *et al.*, 2010). La protéine Arf1 a été décrite ensuite comme facteur cellulaire nécessaire à la réplication de HCV (Matto *et al.*, 2010) (Zhang *et al.*, 2012). L'inhibition de Arf1 aboutit à la redistribution de NS5A et de NS3 vers les GL périphériques indiquant un rôle de cette protéine dans le fonctionnement des complexes de réplication (Matto *et al.*, 2010). Par ailleurs Arf1 et GBF1 contrôlent le maintien d'un environnement riche en PI4P qui est nécessaire à la réplication de HCV (Zhang *et al.*, 2012).

La réplication de l'entérovirus EV71 appartenant à la famille des *Picornaviridae* est sensible à la BFA. En effet la voie de sécrétion GBF1-Arf1-COPI est impliquée dans le processus de réplication. GBF1 est un facteur cellulaire nécessaire. Il semble agir en activant les protéines G Arf de la classe I (Arf1 et 3). Il semble que l'action combinée de Arf1 et Arf3 soit nécessaire à la réplication de l'entérovirus

EV71 (Wang *et al.*, 2014b).

En utilisant une approche d'interactions entre deux protéines, une association étroite a été décrite entre la voie de sécrétion de la cellule et la réplication du virus de la dengue, un virus de la famille des *Flaviviridae*. GBF1 a été décrit comme facteur cellulaire impliqué dans l'étape de réplication virale. GBF1 semble avoir un rôle additionnel pendant la réplication du virus de la dengue, différent de celui pour le maintien de la morphologie du cis-Golgi. Une autre étude montre que l'inhibition simultanée de Arf4 et Arf5 inhibe la sécrétion du virus de la dengue, indiquant ainsi une redondance d'action entre ces protéines. Leur fonction n'est pas encore bien connue pendant l'étape de sécrétion des *flaviviridae*, mais ne couvre pas la totalité de cette famille virale (Kudelko *et al.*, 2012).

1. Objectifs du travail

GBF1 est le facteur cellulaire sensible à la BFA et nécessaire à la réplication de HCV. Son rôle pendant l'étape de réplication de HCV n'est pas connu. Il n'est pas nécessaire pour la formation des remaniements membranaires qui sont le siège de la réplication mais semble être nécessaire pour une étape de maturation de ces membranes ou semble intervenir pendant leur fonctionnement. GBF1 n'est pas composant des complexes de réplication de HCV (Goueslain *et al.*, 2010). Aucune interaction entre GBF1 avec les protéines virales n'a été observée jusqu'à présent. Ces données suggèrent que GBF1 semble réguler la réplication de HCV en activant une protéine G de la famille Arf qui serait responsable du recrutement d'effecteurs de la réplication. L'objectif principal de ce travail était d'identifier le mécanisme par lequel GBF1 régule la réplication de HCV.

Afin d'expliquer le mécanisme par lequel GBF1 régule la réplication de HCV, plusieurs méthodes ont été utilisées. Premièrement nous avons voulu déterminer quelles protéines virales sont impliquées dans l'action de GBF1. Pour cela, nous avons voulu sélectionner des virus HCV capables de se répliquer en présence d'un inhibiteur de GBF1 : la BFA. Cette stratégie pourrait amener à trouver de possibles mutations d'adaptation dans l'ARN de HCV et conduire à délimiter des interactions génétiques entre HCV et GBF1. Deuxièmement, d'une manière complémentaire, nous avons sélectionné des cellules résistantes à la toxicité induite par la BFA. Nous avons ensuite analysé l'infection HCV dans ces cellules. L'intérêt de ces cellules réside dans le fait que la toxicité de la BFA est très faible et par conséquent pouvoir étudier GBF1 en contournant le problème de toxicité. Troisièmement, nous avons étudié la voie en aval de GBF1 pendant l'infection HCV. La protéine G Arf1 a déjà été décrite comme nécessaire à l'infection HCV (Matto *et al.*, 2010) (Zhang *et al.*, 2012). Les protéines G Arf possèdent une série d'effecteurs qui régulent des fonctions différentes dans la cellule. En plus de la voie de sécrétion, les protéines Arf régulent des enzymes du métabolisme lipidique, qui s'avère en lien avec la réplication de HCV. Les résultats attendus peuvent apporter des indications sur le mécanisme par lequel GBF1 régule la réplication de HCV.

2. Sélection de virus HCV résistants à l'inhibition par la BFA

Afin de trouver des interactions possibles entre les protéines virales et GBF1, nous avons infecté des cellules Huh-7 avec un virus HCV contenant un gène de sélection : la puromycine acétyl-transférase. Une fois infectées, les cellules sont sélectionnées avec de la puromycine, la BFA a été rajoutée afin de pouvoir sélectionner les cellules infectées qui peuvent répliquer leur ARN en présence de BFA. Le clone sélectionné n'a montré aucune mutation d'adaptation dans le génome viral (figure 22). Les expériences supplémentaires ont pu montrer que la résistance à la BFA de ces cellules était d'origine cellulaire. L'action de la BFA sur GBF1 bloque le transport dont celui des protéines néosynthétisées dans le RE. Ce blocage provoque le stress du RE et finit par induire la voie d'apoptose dans la cellule. Il semble donc que les cellules infectées sélectionnées par cette méthode contournaient l'apoptose via différents mécanismes indépendamment de la présence de l'infection. Il serait intéressant de reprendre cette sélection avec un autre protocole de manière à minimiser la sélection de cellules résistantes et d'augmenter nos chances de sélectionner des mutations d'adaptation dans le génome du virus. Ceci pourrait être fait en utilisant une méthode de passages successifs du virus en présence de BFA au début de l'infection seulement (période où le virus est le plus sensible à la BFA). L'identification de mutations de résistance pourrait délimiter des interactions entre HCV et GBF1.

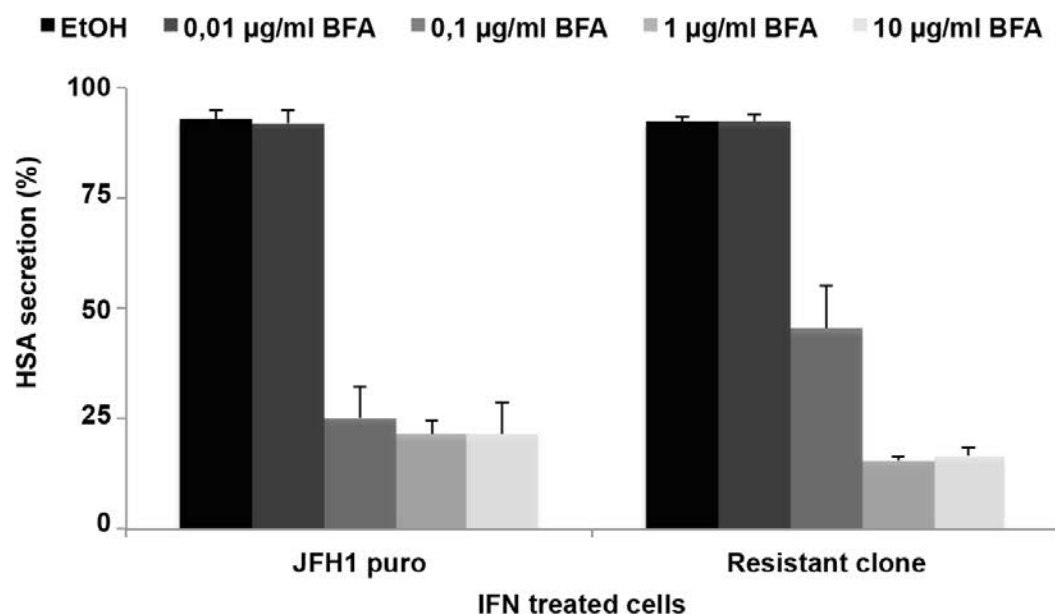
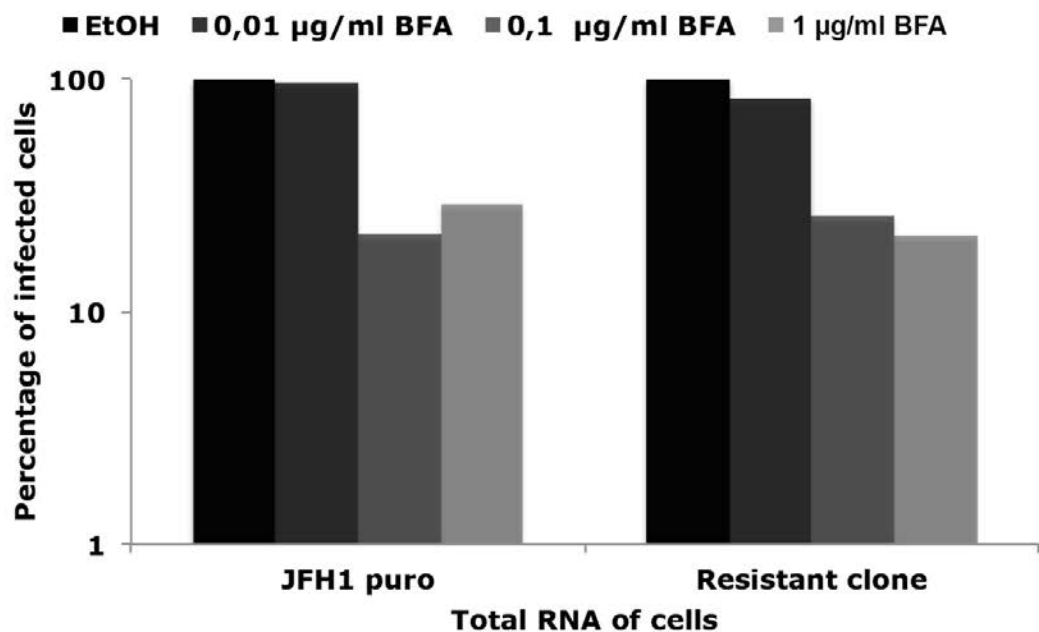


Figure 22 : (A) Les ARN totaux extraits à partir des cellules infectées par ce clone ou par le clone sauvage ont été électroporés dans des cellules Huh-7 naïves. Le pourcentage de cellules infectées en présence de concentrations de BFA a été calculé suite à une immunofluorescence avec un anti-E1
(B) Les cellules infectées avec le clone résistant ou le sauvage ont été utilisées pour effectuer un dosage de HSA en présence de BFA sur 24h

3. Sélection de cellules résistantes à l'apoptose induite par la BFA

D'une manière complémentaire au travail précédent, nous avons sélectionné des cellules résistantes à la BFA. Elles ont été sélectionnées à partir de la lignée permissive au virus Huh-7 avec des concentrations de BFA allant de 40 à 100 ng/ml.

Ces lignées peuvent être divisées en 2 groupes : les lignées du groupe I (R1, R2) nécessitent 100 fois plus de BFA que les Huh-7 pour montrer des phénotypes semblables aux lignées parentales en viabilité cellulaire, sécrétion d'albumine et infection HCV. Les lignées du groupe II (R3 à R7) sont environ 10 fois plus résistantes à la BFA que les Huh-7 concernant la viabilité cellulaire et la sécrétion d'albumine, mais conservent presque la même sensibilité à l'infection HCV que les Huh-7.

La résistance du groupe I est expliquée par une mutation ponctuelle dans le domaine sec7 de GBF1 (M832L) connue pour diminuer l'affinité de la BFA à GBF1. Il semblerait que ce résidu M832 participe par des liaisons van der Waals à l'interaction du domaine sec7 avec la BFA. Nous avons pu montrer que l'expression du GBF1-M832L complète l'infection HCV (Goueslain *et al.*, 2010). La viabilité cellulaire et la sécrétion d'albumine. Cette mutation ponctuelle explique donc certainement le phénotype des lignées R1 et R2. Le phénotype observé pour les cellules du groupe II, n'est pas associé à des mutations dans les cibles connues de la BFA, puisqu'aucune mutation n'a été trouvée dans GBF1, BIG1, BIG2 ou même dans les Arf sensibles à la BFA (Arf1- Arf3- Arf4- Arf5). La raison la plus probable de leur résistance pourrait être recherchée dans la voie inductrice de l'apoptose en réponse au blocage de sécrétion des protéines par la BFA. L'étude de cette voie appelée UPR (unfolded protein response) pourrait fournir des renseignements supplémentaires sur l'origine de leur résistance. D'éventuels phénomènes compensatoires peuvent être à l'origine du fonctionnement partiel du système de sécrétion de ces cellules en présence de BFA.

D'une manière inattendue, pour des concentrations de BFA comprises entre 1 et 10 µg/ml BFA, le cis-Golgi des R1 et R2 était désassemblé, et pourtant la voie de sécrétion était toujours fonctionnelle. Ceci indique l'existence d'une dichotomie entre la morphologie du cis-Golgi et la fonctionnalité de la voie de sécrétion. De la même manière pour les Huh-7, les EC50 de l'inhibition de la sécrétion et du changement de la

morphologie du cis-Golgi sont différentes. Dans les mêmes conditions, les MDCK ne montrent pas de changements morphologiques du Golgi, mais seulement à des concentrations plus élevées par rapport aux R1, R2. Ces résultats confirment que la mutation M832L diminue la liaison de la BFA à GBF1 et suggèrent qu'elle ne l'inhibe pas complètement (Peyroche *et al.*, 1999) (Niu *et al.*, 2005). Ceci pourrait être expliqué par le fait que le résidu M832 n'est pas le seul à engager des interactions avec la BFA.

La différence de sensibilité de la morphologie du Golgi en présence de BFA entre les R1, R2 d'une part et les MDCK d'autre part reste inexpliquée. Cette dernière pourrait être en relation avec le nombre de copies du GBF1-M832L. Les cellules de chien n'expriment que le GBF1 mutant, tandis que dans les R1, R2 on trouve une co-expression des protéines sauvage et mutée. Il a été rapporté que dans des cellules HeLa, le changement de la morphologie du cis-Golgi pouvait résulter de l'effet de la BFA sur BIG1 (Boal *et al.*, 2010). Nous n'avons pas observé d'effet sur la morphologie du Golgi en réduisant l'expression de BIG1 dans les Huh-7 à l'aide de siRNA.

La fonction précise de GBF1 pendant l'infection HCV reste à élucider. Par ailleurs, il a été montré que GBF1 était impliqué dans la réplication de plusieurs virus à ARN de polarité positive comme les *Picornaviridae*, *Coronaviridae* et *Flaviviridae* (Belov *et al.*, 2008) (Lanke *et al.*, 2009) (Goueslain *et al.*, 2010). La réplication de ces virus se fait dans des structures membranaires provenant du RE. Nous supposons que GBF1 joue un rôle dans le recrutement de lipides et/ou de protéines indispensables pour les complexes de réplication HCV (Goueslain *et al.*, 2010). Ces données consolident les observations des résultats des cellules résistantes du groupe II, puisque pour la valeur de 1 µg/ml BFA l'infection HCV est totalement inhibée pourtant la voie de sécrétion est partiellement fonctionnelle (18-44%). Cette différence de sensibilité à la BFA entre l'infection HCV et la voie de sécrétion de la cellule est en faveur d'une fonction additionnelle de GBF1 pendant l'infection, distincte de son rôle de régulation de la voie de sécrétion.

Il a été montré que le domaine N-terminal de GBF1, dépourvu du domaine sec7 pouvait compléter l'inhibition de la réplication du poliovirus par la BFA, ce qui indique que l'effet de GBF1 sur l'infection poliovirus n'implique pas le domaine sec7 ou l'activation de Arf1. En ce qui concerne le HCV, nous avons aussi pu montrer que Arf1 était nécessaire à l'infection, ce qui n'empêche pas un éventuel rôle supplémentaire de GBF1 qui ne passerait pas par l'activation de Arf1. Il serait donc intéressant de vérifier si le

domaine N-terminal de GBF1 était capable de compléter l'inhibition de l'infection HCV par la BFA.

Les résultats de cette partie font l'objet de la publication :

Farhat, R., Goueslain, L., Wychowski, C., Belouzard, S., Fénéant, L., Jackson, C. L., Dubuisson, J. & Rouillé, Y. (2013). Hepatitis C virus replication and Golgi function in brefeldin a-resistant hepatoma-derived cells. *PLoS ONE* **8**, e74491

1^{ère} Partie

Hepatitis C virus replication and Golgi function in brefeldin A-resistant hepatoma-derived cells

**Rayan Farhat¹, Lucie Goueslain², Czeslaw Wychowski¹, Sandrine Belouzard¹,
Lucie Fénéant¹, Catherine L Jackson², Jean Dubuisson¹, Yves Rouillé^{1, *}**

¹ Inserm U1019, CNRS UMR8204, Center for Infection & Immunity of Lille (CIIL),
Institut Pasteur de Lille, Université Lille Nord de France, Lille, France

² Institut Jacques Monod, CNRS UMR 7592, Université Paris Diderot, Sorbonne
Paris Cité, Paris, France

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: yves.rouille@ibl.fr ;
Tel.: +33-320-871-027; Fax: +33-320-871-201.

ABSTRACT

Recent reports indicate that the replication of hepatitis C virus (HCV) depends on the GBF1-Arf1-COP-I pathway. We generated Huh-7-derived cell lines resistant to brefeldin A (BFA), which is an inhibitor of this pathway. The resistant cell lines could be sorted into two phenotypes regarding BFA-induced toxicity, inhibition of albumin secretion, and inhibition of HCV infection. Two cell lines were more than 100 times more resistant to BFA than the parental Huh-7 cells in these 3 assays. This resistant phenotype was correlated with the presence of a point mutation in the Sec7 domain of GBF1, which is known to impair the binding of BFA. Surprisingly, the morphology of the cis-Golgi of these cells remained sensitive to BFA at concentrations of the drug that allowed albumin secretion, indicating a dichotomy between the phenotypes of secretion and Golgi morphology. Cells of the second group were about 10 times more resistant than parental Huh-7 cells to the BFA-induced toxicity. The EC₅₀ for albumin secretion was only 1.5-1.8 fold higher in these cells than in Huh-7 cells. However their level of secretion in the presence of inhibitory doses of BFA was 5 to 15 times higher. Despite this partially effective secretory pathway in the presence of BFA, the HCV infection was almost as sensitive to BFA as in Huh-7 cells. This suggests that the function of GBF1 in HCV replication does not simply reflect its role of regulator of the secretory pathway of the host cell. Thus, our results confirm the involvement of GBF1 in HCV replication, and suggest that GBF1 might fulfill another function, in addition to the regulation of the secretory pathway, during HCV replication.

INTRODUCTION

The replication of single-stranded positive RNA viruses occurs in association with rearranged intracellular membranes. For the hepatitis C virus (HCV) these membrane rearrangements have been named membranous web. Different types of HCV-induced membrane structures have been observed depending on the experimental model. The membranous web was initially described in U-2 OS cells inducibly expressing the HCV polyprotein [1], indicating that its formation depends on HCV protein expression, even without RNA replication. It was composed of small vesicles embedded in a membrane matrix. Similar membrane alterations were later observed in Huh-7 cells harboring a subgenomic replicon of genotype 1b [2] and in JFH1-infected Huh-7 cells [3]. In replicon-containing cells, it was reported to contain the nonstructural proteins NS3/4A, NS4B, NS5A and NS5B, and the genomic RNA [2]. Moreover, newly synthesized viral RNA was also detected in the membranous web, clearly indicating that it is a site of viral RNA synthesis [2].

In addition to the membranous web, a second type of HCV replicase was observed in Huh-7 cells containing a GFP-tagged replicon. This second type of replicase was made of smaller structures much more mobile than the membranous web, and scattered throughout the cell [4]. In highly permissive Huh-7.5 cells replicating a subgenomic replicon of the JFH1 strain at high levels, the membrane alterations were shown to be much more extensive, with the occurrence of numerous double membrane vesicles and of multivesicular structures [5] that had not been observed before with replicons of genotype 1b. These double membrane vesicles, together with single membrane vesicles were also observed in JFH1-infected Huh-7.5 or Lunet cells [6,7]. It is unclear whether the difference of morphological alterations observed in these various studies primarily results from the host cell, the viral genotype or both.

The formation and the functioning of the membranous web are still poorly understood. Two viral proteins, NS4B and NS5A, appear to play a major role in the induction of membrane rearrangements [1,6]. Based on morphological data showing a close association between the ER and the HCV replicases [1,4-6,8], and on biochemical data indicating that HCV RNA replication takes place in a compartment that sustains endoglycosidase H-sensitive glycosylation [9], the membranous web was proposed to be derived from the ER membrane. However, several endosomal

markers were also observed colocalizing with HCV replicases and/or functionally involved in RNA replication [6,10-12]. One major host factor implicated in HCV RNA replication is the phosphatidylinositol-4 kinase-III α (PI4KIII α , also known as PI4KA) [11-16], an enzyme of the ER, which interacts with, and is activated by NS5A during HCV replication [16-18]. Its depletion by RNA interference leads to morphologically aberrant NS5A-positive structures in cells expressing the HCV polyprotein [6,12,18].

Recently, we and others found a role for the GBF1-Arf1-COP-I pathway in HCV replication [12,19-21]. GBF1 is a guanine nucleotide exchange factor (GEF), which is recruited to the membrane of the cis-Golgi and activates the G-protein Arf1. Once activated by the binding of GTP, Arf1 in turn recruits different effectors, including the coat protein complex COP-I, which then forms vesicular carriers. This pathway mediates the retrograde transport from the cis-Golgi and the ERGIC to the ER [22,23], and is also implicated in the biogenesis of lipid droplets [24-26]. Its inhibition by brefeldin A induces the collapse of the Golgi complex, the redistribution of Golgi glycosidases to the ER, and the block of the secretory pathway at the level of the ER exit. The precise role of this pathway in HCV replication is still unclear. Several other single-stranded positive RNA viruses of the *Picornaviridae* and *Coronaviridae* families also rely on this pathway for their replication [27-29]. The inhibition of HCV replication by brefeldin A is much stronger at the beginning of the infection than when the infection is already established [19], suggesting a crucial role at the onset of replication. The other GBF1-dependent RNA viruses, which do not establish chronic infections unlike HCV, do not share this special requirement for GBF1 early during infection. GBF1 does not appear to be a component of HCV replication complexes, because it did not co-localize with NS5A, a marker of HCV replication complexes, in confocal microscopy. The formation of membranous web-like structures in U-2 OS cells expressing the HCV polyprotein was not inhibited by brefeldin A, suggesting a role of the GBF1-Arf1-COP-I pathway in the functioning of the replication complexes rather than in their formation. Similarly, GBF1 does not seem to be required for the formation of membranous replication complexes of other single-stranded positive RNA viruses, such as poliovirus [27], and mouse hepatitis virus [28].

To gain more insight into the role of this pathway during HCV replication, we generated Huh-7-derived cell lines resistant to brefeldin A. We analyzed HCV replication and membrane traffic in these cell lines, and found that they can be

classified into two phenotypes, one of which results from a mutation in the coding sequence of GBF1.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), phosphate-buffered saline (PBS), trypsin-EDTA, OptiMEM, Oligofectamine, goat serum, and fetal calf serum (FCS) were purchased from Life Technologies. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was from Molecular Probes. Golgicide A and Mowiol 3-88 were from Calbiochem. Protease inhibitors cocktail Complete was from Roche. Other chemicals were from Sigma.

Antibodies.

Mouse anti-E1 MAb A4 [30] was produced in vitro by using a MiniPerm apparatus (Heraeus) as recommended by the manufacturer. Sheep anti-NS5A antiserum [31] was kindly provided by Dr M. Harris (University of Leeds). Mouse anti-CD71 (transferrin receptor) MAb was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Sheep anti-TGN46 was from Serotec. Mouse anti-GBF1, anti-EEA1, and anti-GM130 MAbs were from Transduction Laboratories. Rabbit anti-BIG1 was from Bethyl Laboratories. Mouse anti-Arf1 MAb 1D9 was from Abcam. Mouse anti- β tubulin MAb (TUB 2.1) was from Sigma. Mouse anti-HSA (ZMHSA1) was from Invitrogen. Goat anti-HSA (507313) was from Calbiochem. Goat anti-ApoE was from Millipore. Alexa 555-conjugated donkey anti-sheep IgG antibody was from Invitrogen. Peroxidase-conjugated goat anti-mouse, anti-rabbit, and anti-sheep IgG, and cyanine 3-conjugated goat anti-mouse IgG were from Jackson Immunoresearch.

Cell culture

Huh-7 [32], and MDCK (kindly provided by Dr Véronique Fafeur, Institut de Biologie de Lille, France) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), high glucose modification, supplemented with glutamax-I, sodium pyruvate, and 10% heat-inactivated fetal bovine serum. Huh-7-derived, BFA-resistant cells were selected and grown in the presence of BFA (40 to 100 ng/ml) in the same culture medium.

HCVcc

The virus used in this study (JFH1-CSN6A4) was based on JFH1 [33], and contained cell culture adaptive mutations [34] and a reconstituted A4 epitope in E1, as described previously [19]. Luciferase-based assays were performed using an HCVcc containing the same cell culture adaptive mutations and expressing the *Renilla* luciferase reporter HCVcc-Rluc, as previously described [35]. An in-frame deletion introduced in the core-coding region of the HCVcc-Rluc construct was as previously described [36]. Nonreplicative control contained a GND mutation in the NS5B active site, as previously reported [33].

For the HCVcc infection assay, sub-confluent naïve Huh-7 cells grown in a 24-well plate were incubated with 200 µl of HCVcc-Rluc in the presence of BFA for 2 hours at 37°C, and the inoculate was replaced with fresh culture medium. Infected cells were cultured in the presence of BFA up to 6 hpi. Cells were lysed with 50 µl of 1X *Renilla* lysis buffer (Promega) at 24 hpi and the infection was scored by the measure of luciferase activity using a *Renilla* Luciferase Assay kit, as indicated by the manufacturer (Promega).

For the replication assay, cells were electroporated with HCVcc-Rluc/ Δ core or HCVcc-Rluc/GND RNA, and plated in 24-well plates in the presence of increasing concentrations of BFA. The BFA was removed 8 h later and the cells were further cultured without BFA. The luciferase activity was measured 4 h, 24 h, 48 h and 72 h post-electroporation. Luciferase activity at 4 hpi was expressed as 1 and the measures at other time points were normalized accordingly.

RNA interference.

RNA interference experiments were carried out with pools of four different synthetic double-stranded siRNAs to the same target (on-target plus smart pool reagents from Dharmacon), as previously described [19]. A single non-targeting siRNA (D-001810-01), which has no impact on HCV infection, was used as a negative control. Briefly, sub-confluent cultures of Huh-7 cells in six-well clusters were transfected with 80 pmol of siRNA complexed with 4 µl of Oligofectamine in a total volume of 1 ml of OptiMEM per well for 6 h. Cells were trypsinized 24 h after siRNA transfection, plated in 24-well clusters, and analyzed by immunofluorescence 3 days after siRNA transfection.

For quantifying HCVcc infection, siRNA-treated cells were infected 24 h after trypsinization. Just before infection, extra wells of cells treated with each siRNA were

counted to ensure that equal numbers of cells were infected. Relative expression levels of targeted proteins were analyzed by immunoblotting equal amounts of cell lysates. HCVcc infection was quantified by measuring NS5A expression levels by immunoblotting at 30 hpi.

Immunofluorescence

Cells were processed for indirect immunofluorescent detection of viral proteins and cellular markers as previously described [3]. Images were acquired with an LSM710 confocal microscope (Zeiss) using a 63X/1.4 numerical aperture oil immersion objective. Signals were sequentially collected by using single fluorescence excitation and acquisition settings to avoid crossover. Images were assembled using Adobe Photoshop software.

Immunoblotting

Cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-Cl buffer pH 7.5 containing 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and protease inhibitors) for 20 min on ice. Cells were collected, and the nuclei were pelleted. The protein concentration in the postnuclear supernatants was determined by the bicinchoninic acid method as recommended by the manufacturer (Sigma), using bovine serum albumin as standard. Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-ECL; Amersham) by using a Trans-Blot apparatus (Bio-Rad). The proteins of interest were revealed with specific primary antibodies, followed by species-specific secondary antibodies conjugated to peroxidase, and enhanced chemiluminescence detection as recommended by the manufacturer (ThermoFischer). Signals were recorded with a LAS3000 imager (Fujifilm). Unsaturated signals were quantified with the gel macro of the ImageJ software.

Viability assay

Sub-confluent cell cultures grown in 96-well plates were incubated with BFA for 24 h. An MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]-based viability assay (CellTiter 96 aqueous nonradioactive cell proliferation assay from Promega) was conducted as recommended by the manufacturer.

Albumin secretion assay

Sub-confluent cell cultures grown in 12-well plates were incubated for 24 h in 1 ml of complete culture medium containing BFA. Culture media were collected and centrifuged to remove cells debris. Cells were rinsed with PBS, and lysed in lysis buffer for 20 min on ice. The HSA concentration in the supernatants and lysates was determined by ELISA, using human serum albumin (HSA) as standard, as described [37]. The percentage of secretion was calculated as the percentage of HSA in the medium divided by the total amount of HSA in the medium and the lysate.

GBF1 Sequencing

Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA II kit, as described by the manufacturer (Macherey-Nagel). GBF1 cDNA was obtained using the Expand Reverse Transcriptase and amplified by PCR using the High Fidelity DNA polymerase (Roche). Overlapping PCR products were purified in 1% agarose gel and were sent to Genoscreen to perform Sanger sequencing. The sequences of the primers used for the reverse transcription step (RT1 to 3) and the PCR and sequencing steps are described in table S1.

Transfection

Huh-7 cells were transfected with expression vectors for yellow fluorescent protein (YFP), YFP-tagged inactive mutant (E794K), or BFA-resistant mutant (M832L) GBF1 [38] using the transfection reagent TransIT-LT1, as recommended by the manufacturer (Mirus).

RESULTS

Isolation of Huh-7-derived cell lines resistant to brefeldin A

BFA-resistant cells were selected by cultivating Huh-7 cells in the presence of low doses of BFA. Most of the cells died in less than a week. Cells that survived were grown and passaged in the continuous presence of BFA for at least 2 months before characterization. Seven independent cell lines (named R1 to R7) were selected (table 1).

The toxicity of BFA was assessed by measuring the cell viability after a 24h-incubation in the presence of increasing concentrations of the drug. Cellular viability of Huh-7 cells decreased in the presence of 0.1 µg/ml of BFA or higher doses (figure 1). In two of the selected cell lines (R1 and R2), cells showed only a partial decrease

(≈25%) of viability at the concentration of 10 µg/ml of BFA, with no impact of the lower doses (figure 1). For the other cell lines (R3 - R7), the resistance to BFA was intermediate between those of parental Huh-7 cells and of resistant R1 and R2 cells. Their viability was reduced for the concentrations of 1 µg/ml and 10 µg/ml of BFA, with little or no effect of the concentration 0.1 µg/ml, even for the R4 cell line, which had been selected with a 50 ng/ml BFA concentration (figure 1). As expected, BFA had no effect on growth of MDCK cells [39,40], which were used as a control in this experiment. These results allowed us to divide resistant cell lines into 2 groups depending on their degree of resistance to BFA. Cells of group 1 (R1 and R2) were more than 100 times more resistant to growth inhibition by BFA than Huh-7, and cells of group 2 (R3 to R7) were about 10 times more resistant.

Action of BFA on HCV infection in resistant cell lines

To assess the sensitivity of HCV infection to BFA in resistant cell lines, Huh-7 and resistant cell lines were infected with a recombinant HCVcc expressing the *Renilla* luciferase in the presence of increasing doses of BFA, and luciferase activity was quantified at 24 hpi. At this time post-infection, there are no re-infection events. This allows assessing the activity of the drug on the replication step of the HCV life cycle only. As previously reported [19], HCVcc infection in Huh-7 cells was inhibited in a dose-dependent manner, the lowest inhibitory concentration of BFA being 0.1 µg/ml (figure 2). Similar inhibitory patterns were observed in cells of group 2. Although the relative HCV infection was slightly higher in resistant cells of this group than in control Huh-7 cells with the doses of 0.1 and 1 µg/ml BFA, the EC₅₀ were very similar for the R3 to R6 cell lines (in the range of 0.03-0.06 µg/ml) and for Huh-7 cells (≈ 0.04 µg/ml). Only R7 cells appeared slightly more resistant to HCV infection with an EC₅₀ of ≈ 0.3 µg/ml. In contrast, HCVcc infection was much less susceptible to BFA in R1 and R2 cells, in which a partial inhibition of HCV infection was only observed with a concentration of 10 µg/ml (figure 2). Therefore, the resistant cells displayed dramatically different sensitivity to BFA with regard to HCVcc infection, group 1 cells being resistant to BFA inhibition of HCV infection, and group 2 cells sensitivity being very similar to that of Huh-7 cells.

BFA was previously shown to inhibit HCV infection at the replication step [19]. To confirm the resistance to BFA inhibition of HCV replication in R1 and R2 cells, we electroporated Huh-7, R1 and R2 cells with in vitro transcribed genomic RNA of an

HCVcc construct expressing the *Renilla* luciferase and deleted from a major part of the core coding sequence in order to avoid BFA impact on viral egress and re-infection. Electroporated cells were treated for 8 hours with increasing concentrations of BFA, then the drug was removed and the luciferase activity was monitored as a measure of the replication. As previously described [19], the replication was inhibited by BFA in a dose-dependant manner in Huh-7 cells (figure S1). In contrast, the replication was insensitive to BFA in R1 and R2 cells, as shown by very similar curves of luciferase activity, regardless of the concentration of BFA (figure S1). These results indicate that the resistance to BFA inhibition of HCV infection in R1 and R2 cells results from a lack of action of BFA on the replication step of the HCV life cycle.

We previously established that the BFA sensitivity of HCV infection results from the inhibition of GBF1 function [19]. In addition to GBF1, there are 14 other known Arf-GEFs in mammalian cells, most of them being BFA-insensitive [23]. Therefore, the resistance of HCV infection to BFA inhibition in R1 and R2 cells could have resulted from a shift of Arf-GEF usage from GBF1 to another BFA-insensitive Arf-GEF during HCV replication. To confirm that HCV infection in R1 and R2 cells was still dependent on GBF1, we performed siRNA-mediated depletion of GBF1 and analyzed the impact on HCV infection by quantifying NS5A expression. As previously reported [19], a reduction of about 70-80% of GBF1 expression induced an inhibition of HCV infection of about 50% in Huh-7 cells (figure 3A). The depletion of BIG1, another BFA-sensitive Arf-GEF not involved in HCV replication [19], only had a slight, non-significant effect, as compared to the untransfected control, whereas the depletion of the PI4KIII α , a host factor essential for HCV replication, inhibited NS5A expression by about 80% in the same experimental setting (figure 3A). The levels of inhibition imposed by GBF1, BIG1 or PI4KIII α depletions were very similar in Huh-7, R1 and R2 cells (figure 3B). These results indicate that, despite its resistance to BFA inhibition, HCV infection in R1 and R2 cells still depends on GBF1.

In addition to GBF1, HCV replication also requires Arf1 function [20,21]. We therefore tested whether HCV replication in R1 and R2 cells was still dependent on Arf1, using siRNA-mediated depletion. Arf1-depletion resulted in about 50-60% inhibition of HCV infection in Huh-7 cells, as compared to cells transfected with a control non-targeting siRNA, despite an apparently moderate efficiency of Arf1 siRNA (figure 3C).

However, the actual efficiency of Arf1 depletion is probably underestimated, since the anti-Arf1 antibody we used cross-reacts with other Arf family members. Very similar inhibitory patterns were observed in Huh-7, R1, and R2 cells (figure 3D), indicating that HCV infection depends on Arf1 in R1 and R2 cells.

Our results indicate that HCV infection of R1 and R2 resistant cells requires GBF1 and Arf1, as in parental, BFA-sensitive Huh-7 cells. This suggests that the absence of BFA inhibition could result from the selection of cells expressing a BFA-resistant form of GBF1 or Arf1.

Action of BFA on secretion in resistant cell lines

Since BFA blocks secretion in a GBF1-dependent manner, we tested the functionality of the secretory pathway of the resistant cells in the presence of BFA. We quantified the secretion of human serum albumin (HSA) using an ELISA assay. HSA is strongly expressed in Huh-7 cells and is constitutively secreted. BFA blocks protein transport and has no effect on protein synthesis [41]; we therefore measured HSA in cell lysates and supernatants and quantified HSA secretion as the percentage of secreted protein during a 24-h period. HSA secretion was almost completely (>95%) blocked by BFA in Huh-7 cells at 0.1 µg/ml and higher concentrations (figure 4A).

The resistant cell lines expressed similar or reduced levels of albumin, as compared to Huh-7 cells (figure 4B). Concerning HSA secretion, the two groups of resistant cells again displayed different sensitivities to BFA. HSA secretion from R1 and R2 cells showed a small reduction at the concentration of 10 µg/ml BFA only, with no effect of the lower doses. In contrast, the cells of group 2 showed a partial residual HSA secretion at the concentration of 0.1 µg/ml and reached a maximal inhibition at 1 µg/ml (figure 4). The EC₅₀ was shifted from 0.06 µg/ml in Huh-7 cells to 0.09-0.11 µg/ml in cells of the R3-R7 lines. However, the main difference with Huh-7 cells was the higher rate of secretion in the presence of 1 and 10 µg/ml of BFA. The residual albumin secretion at these concentrations of BFA was comprised between 18% (for R4) and 44% (for R7) of the secretion in the absence of BFA, whereas in Huh-7 cells the residual secretion was about 3%.

The reduced BFA-induced inhibition of protein secretion in R1 and R2 cells was confirmed with apolipoprotein E (apoE), which is a component of VLDL particles that

are secreted by Huh-7 cells. Huh-7, R1 and R2 cells were treated for 8 hours with increasing concentrations of BFA, and the levels of apoE in cells and conditioned media were investigated by immunoblotting. As shown in figure 4C, apoE was absent from the medium of cells treated by BFA at 0.1 µg/ml or higher concentrations, and the levels of apoE were increased in the corresponding cell lysates, indicating an inhibition of the secretion of apoE. In contrast, apoE remained secreted from R1 and R2 cells in the presence of up to 1 µg/ml of BFA, and BFA only blocked apoE secretion at 10 µg/ml (figure 4C). These results confirmed the reduction of BFA-induced inhibition of secretion in R1 and R2 cells. Altogether, the data indicate the existence of different mechanisms of resistance to BFA in the two groups of cells, and suggest the presence of BFA-resistant forms of GBF1 in R1 and R2 cells.

Identification of a mutation in the Sec7 domain of GBF1 in R1 and R2 cells

The lack of BFA inhibition of secretion in R1 and R2 cells could result from a mutation that reduces the interaction of BFA with its target, the GBF1-Arf•GDP complex. To investigate this hypothesis, we sequenced the coding sequence of GBF1 and of the four known BFA-sensitive human Arfs (Arf1, Arf3, Arf4 and Arf5). Three isoforms of GBF1 have been reported [42]. We only detected the expression of GBF1 isoform 3 (Genbank accession number NM_001199379.1) in Huh-7 and Huh-7-derived cells. The complete GBF1 coding sequence was determined. Four point mutations were found, as compared to the reference sequence. These mutations led to amino-acid substitutions at positions 547, 1396, 1725, and 1833 of the coding sequence of GBF1 isoform 3 (table 2). All these mutations were present together with the wild type sequence (data not shown), suggesting that only one copy of the gene was mutated. One of these mutations changes the residue of tyrosine 547 for an asparagine in the HUS domain, the function of which is unknown [43]. The mutated Y547N residue is located two residues away from the highly conserved "HUS box", which is the most highly conserved region of GBF/BIG GEFs outside of the Sec7 domain [43]. The three other mutations lie in non-conserved interdomain regions. The same set of mutations was found in Huh-7 cells and in cells from group 2 cells (data not shown). We therefore conclude that none of these mutations could account for the moderate resistance to BFA of these cells.

In contrast, we observed in R1 and R2 cells a mutation that was absent from GBF1 of Huh-7 and cells of group 2. It is a substitution of a thymine by an adenine at

position 2788 of the sequence of reference. This mutation leads to the change of the methionine 832 ATG codon into a leucine TTG codon (figure 5A). This mutation affects a residue of the Sec7 domain, which is the domain interacting with Arf and with BFA. In both cell lines, the mutation was observed together with the wild type sequence, suggesting that only one copy of the GBF1 gene is mutated in R1 and R2 cells (figure 5A).

We also sequenced the Sec7 domains of the two other BFA-sensitive Arf-GEFs (BIG1 and BIG2) and the coding sequences of the 4 human Arfs known to be sensitive to BFA inhibition. No additional mutation was observed in any of the resistant cell lines (data not shown).

To test the functional impact of the M832L mutation, a YFP-tagged GBF1 construct containing this mutation was expressed in Huh-7 cells, and the cells were submitted to a BFA challenge. The GBF1-M832L construct induced a protection of the cells to the BFA-induced toxicity, as compared to control cells expressing YFP (figure 5B). In contrast, cells expressing an YFP-tagged GBF1-E794K inactive mutant did not respond differently than YFP-expressing control cells. Similarly, the expression of GBF1-M832L, but not GBF1-E794K, rescued HSA secretion in the presence of BFA (figure 5C). These data confirm the impact of the M832L mutation on BFA sensitivity of GBF1, and indicate that the M832L mutation present in the GBF1 of R1 and R2 cells is responsible for the BFA resistant phenotype of these cells.

Impact of BFA on the morphology of the Golgi and endosomes

BFA treatment is known to alter the morphology of the Golgi and endosomes. To further analyze the impact of the M832L mutation, we investigated the sensitivity of these organelles to BFA in R1 and R2 cells. Huh-7 cells were incubated for 30 min in the presence of 5 µg/ml BFA and processed for immunofluorescent detection of the cis-Golgi marker GM130, the trans-Golgi network marker TGN46, and the transferrin receptor, a marker of recycling endosomes. As already reported for other cell lines, the cis-Golgi labeling was scattered in the presence of BFA (figure 6A), whereas the TGN structure was condensed into a perinuclear dot-like structure (figure 6B), and the recycling endosomes merged into a large network of tubules (figure 6C), also partially labeled with the TGN marker. As expected, EEA1, another endosomal marker, was unaffected by the BFA treatment (data not shown).

The morphological changes of the TGN and recycling endosomes were very similar in R1 and R2 cells (figures 6B and 6C). This sensitivity was expected, since it does not depend on GBF1, but rather on BIG1 and BIG2. Surprisingly, the pattern of GM130 labeling was scattered in R1 and R2 cells, as in Huh-7 cells. When the cells were treated for 30 min with a reduced concentration of 2.5 $\mu\text{g/ml}$ BFA, the pattern of GM130 labeling was again similar in resistant cells and Huh-7 cells, whereas MDCK cells were clearly unaffected (figure 6A), indicating a sensitivity of the cis-Golgi morphology in these R1 and R2 cells, despite the M832L mutation of GBF1. A similar sensitivity of the cis-Golgi morphology to Golgicide A (25 μM), a specific inhibitor of GBF1 function, was also observed with R1 and R2 cells (data not shown).

This BFA sensitivity of the morphology of the Golgi complex of R1 and R2 cells at BFA concentrations that did not inhibit HSA secretion was unexpected. To further characterize this process, we used a wide range of BFA concentrations to assess the relative sensitivities of the cis-Golgi of Huh-7, R1, R2 and MDCK cells. As shown in figure 7, all cells turned out to be responsive to BFA, however with dramatically different sensitivities. The EC_{50} was 12 ng/ml for Huh-7 cells, in the range of 200-300 ng/ml for R1 and R2 cells, and 8.5 $\mu\text{g/ml}$ for MDCK cells (figure S2 and table 3). Interestingly, the morphology of the cis-Golgi appeared approximately 40-50 times more sensitive to BFA than the secretion of HSA in R1 and R2 cells, and only about 5 times in Huh-7 cells.

We also compared relative GBF1 and Arf1 expression levels in Huh-7, R1 and R2 cells by immunoblotting. As shown in figure 8, Huh-7, R1 and R2 cells expressed similar levels of GBF1 and Arf1, indicating that the sensitivity of the Golgi morphology of R1 and R2 cells to BFA, despite the M832L mutation, does not result from increased or reduced expression levels of GBF1 or Arf1. Unfortunately we could not compare the expression levels in MDCK cells, because the antibody did not recognize GBF1 of MDCK cells. We also investigated the intracellular localization of GBF1 by immunofluorescence, and found no difference in the localization between R1, R2 and Huh-7 cells in the absence of BFA or in the presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ BFA (data not shown).

To determine if the inhibition of other BFA-sensitive Arf-GEFs could participate in the change of the cis-Golgi morphology in response to BFA treatment, we used siRNA to specifically deplete GBF1, BIG1 and BIG2. As expected, the depletion of GBF1

induced a dramatic scattering of the GM130 labeling, very reminiscent of the effect of a BFA treatment (figure 9). In contrast, the depletion of BIG1, BIG2 or both BIG1 and BIG2 had no apparent effect on the pattern of GM130 labeling (figure 9), indicating that these two BFA-sensitive Arf-GEFs do not regulate the cis-Golgi morphology. Taken together, these results indicate a dichotomy between functional and morphological effects of the M832L mutation on the Golgi complex.

DISCUSSION

In this study, we selected Huh-7-derived, BFA-resistant cell lines and analyzed their phenotype regarding HCV infection and membrane traffic. Seven independent cell lines were generated using essentially the same selection protocol (except for the cell lines R1 and R4, which were selected using reduced concentrations of BFA), and two different phenotypes were obtained. Two cell lines (R1 and R2) were highly resistant to BFA. More than 100 times more BFA than in Huh-7 cells was required to observe similar effects regarding cell viability, albumin secretion, and HCV infection. On the other hand, the five other cell lines were only 10 times more resistant to BFA-induced toxicity, and about as sensitive as parental Huh-7 cells regarding HCV infection.

The resistance phenotype of the first group of cells (R1 and R2) was correlated with the presence of a point mutation in the Sec7 domain of GBF1, which replaces the methionine residue 832 with a leucine. The M832 residue is part of the BFA binding site at the Sec7-Arf interface. Crystal structures of the complex between the Sec7 domain, BFA and Arf-GDP have been reported for Sec7 domains of a modified, BFA-sensitive Arno [44], and of the yeast GBF1 homolog Gea1 [45]. In both crystal structures, the conserved methionine residue corresponding to M832 of GBF1 engages van der Waals contacts with BFA. Its substitution to a leucine residue has been reported to render GBF1 resistant to BFA in a dominant manner [38,46]. Accordingly, expressing a GBF1-M832L construct in Huh-7 cells resulted in a phenotype of increased resistance to both BFA-induced toxicity and inhibition of HSA secretion. Moreover, we previously showed that the expression of GBF1-M832L renders Huh-7 cells resistant to the BFA-induced inhibition of HCV infection [19]. Therefore, the presence of this mutation in R1 and R2 cells is sufficient to explain the BFA-resistant phenotype of R1 and R2 cells.

The phenotype of the second group of cells (R3 – R7) was not associated with any mutation in the coding sequence of GBF1, of BFA-sensitive Arfs, or of the Sec7 domains of BIG1 and BIG2. The resistance to BFA-induced toxicity was only slightly increased, and could result from increased compensatory mechanisms in selected cells such as a reduced induction of the unfolded protein response (UPR) and/or of UPR-induced apoptosis in response to BFA [47]. The unusual pattern of inhibition of albumin secretion in the presence of increasing doses of BFA again suggests the

existence of compensatory mechanisms, allowing the secretory pathway of these cells to be partially functional at concentrations of BFA that are fully inhibitory for Huh-7 cells. The nature of these putative compensatory mechanisms must await further studies.

Surprisingly, although the secretory pathway of R1 and R2 cells was functional, we consistently observed at BFA concentrations comprised between 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$ a disruption of their cis-Golgi that appeared very similar to what was observed in BFA-sensitive Huh-7 cells. This indicates that the secretory pathway of cells with a BFA-resistant GBF1 is functional in the presence of BFA, in spite of a dramatically disorganized Golgi complex morphology, including the scattering of the cis-Golgi and the collapse of the trans-Golgi network. Our results clearly indicate a dichotomy between BFA impacts on the cis-Golgi scattering and the inhibition of HSA secretion. Even in parental, BFA-sensitive Huh-7 cells, the two effects of BFA were observed at different concentrations. Interestingly, no clear correlation between Golgi morphology and functional secretion was also found in a recent siRNA screen of regulators of Golgi architecture [48]. As previously reported [49], the scattering of the cis-Golgi marker was also observed after siRNA-mediated depletion of GBF1. This is consistent with a role of GBF1 in the regulation of the Golgi morphology, as reported previously [50,51]. Nonetheless, the sensitivity of the Golgi morphology to BFA in R1 and R2 cells with a BFA-resistant GBF1 due to the M832L mutation was more puzzling, especially since MDCK cells, which also have a leucine residue instead of a methionine at position 832 of GBF1, did not appear to have a Golgi morphology sensitive to BFA in the same experimental conditions. However, we found that the morphology of the cis-Golgi of MDCK cells is also sensitive to BFA to some extent. This suggests that the M832L mutation reduces but does not completely abolish the binding of BFA to GBF1. This is consistent with the observation that BFA engages contacts with other residues of the binding site of GBF1 [38,46].

The difference of sensitivity of R1/R2 cells and of MDCK cells remains unexplained. The fact that MDCK cells express GBF1-M832L only, when R1 and R2 cells probably express both the wild type and the mutant protein, could play a role in this difference of sensitivity. We cannot exclude the possibility that differences between the sequences of the proteins of dog and human origin could also contribute to this difference of sensitivity. Additional BFA-sensitive factor might also regulate the

morphology of the cis-Golgi with no impact on secretion. A role for BIG1 as an additional BFA-sensitive factor in the regulation of the cis-Golgi morphology of HeLa cells has recently been proposed [52]. However, we did not observe any impact of BIG1 depletion on the cis-Golgi morphology of Huh-7 cells.

The precise function of GBF1 during HCV replication is still elusive. GBF1 has been reported to be involved in the replication of several positive RNA viruses of the *Picornaviridae*, *Coronaviridae* and *Flaviviridae* families [19,27-29]. For all these viruses, the replication of the genomic RNA takes place in vesicular, rearranged membranes originating, at least in part, from membranes of the early secretory pathway. However, for all these families of viruses, GBF1, which is a major regulator of the early secretory pathway, appears to have no major role in the formation of the rearranged membranes of infected cells, but rather be involved in the functioning of these structures [19,27,28]. We previously hypothesized that GBF1-associated mechanisms might function to deliver proteins or lipids to HCV replication complexes [19]. Our results with the cells of group 2 suggest that the role of GBF1 in HCV replication does not simply reflect its role as a regulator of the protein secretory pathway. Indeed, the pattern of BFA inhibition of HSA secretion does not match the one of HCV infection in these cell lines. HCV infection is completely inhibited by 1 µg/ml BFA, whereas HSA secretion occurs at a rate comprised between 18 and 44% of its secretion in the absence of BFA. This suggests that compensatory mechanisms exist in these cells that allow HSA to be transported out of the ER in the presence of BFA, since this is the main step of the secretory pathway that is inhibited by BFA. However these compensatory mechanisms do not support the replication of HCV, even at a reduced rate. This suggests that GBF1 function during HCV replication does not only reflect the functioning of the secretory pathway, but it could also fulfill an additional function during HCV replication. This additional function could be either related to another cellular function of GBF1, or GBF1 could be, at least in part, diverted from its normal cellular functions during HCV infection. It is worth noting that the inhibition of poliovirus replication by BFA can be largely rescued by expression of only the N-terminus of GBF1, not including the catalytic Sec7 domain [53]. This indicates the existence of a GBF1 function unrelated to Arf1 activation during poliovirus replication. It would be interesting to determine whether a similar situation could be observed with HCV. We and others have shown that Arf1 is required for

HCV replication. However, this does not preclude the existence of an additional GBF1 function unrelated to Arf1 activation during HCV replication. It would be interesting to determine whether GBF1 mutants that do not localize to the Golgi could rescue an infection inhibited by BFA or by GBF1 depletion. In addition to GBF1, BIG1 and BIG2 have been suggested to be involved in the replication of poliovirus [54]. The absence of inhibition of HCV infection by BFA in R1 and R2 cells strongly suggests that GBF1 is the only BFA-sensitive factor required for HCV infection. This indicates that BIG1 and BIG2 are not required for HCV entry or replication.

It has been suggested that GBF1 and Arf1 would be involved in the formation of PI4P in the replication complexes through the trafficking of the PI4 kinase PI4KIII β [21]. The formation of PI4P by PI4KIII β in infected cells has been shown to be essential for the replication of several positive RNA viruses [55]. For HCV, several groups have provided compelling evidence for the involvement of PI4KIII α in HCV replication [11-16]. In contrast, the function of PI4KIII β in HCV replication is still controversial [15,16,18]. It has been shown that NS5A is a critical inducer of PI4P formation through its interaction and activation of PI4KIII α [16,18]. Whether GBF1 and Arf1 contribute to this process is still unknown. It was recently reported that the PI4P produced by PI4KIII α modulates the recruitment of GBF1 by rab1b to the Golgi membrane [56].

In addition to GBF1, Arf1, and COP-I, other regulators of membrane dynamics in the early secretory pathway, including rab1b [57] and its negative regulator TBC1D20 [58,59], have been reported to be involved in the replication of HCV. It is not yet known if these host factors regulate the formation or the functioning of the membranous web, and if their function is related to the one of GBF1 during HCV replication. However it is striking that rab1b is a GBF1-binding partner, which modulates its function in the secretory pathway of non-infected cells [60]. Therefore, even though the function of GBF1 in HCV replication appears to be different from its role of regulator of the secretory pathway, it is tempting to speculate that the virus subverts the whole rab1-GBF1-Arf1-COP-I pathway, normally devoted to the regulation of membrane dynamics in the secretory pathway, for the functioning of the membranous web.

ACKNOWLEDGMENTS.

We thank T. Wakita, M. Harris, and V. Fafeur, for providing us with reagents, and S. Ung for help with preparing the figures. The confocal microscopy data were generated with the help of the Imaging Core Facility of the campus Calmette (Bicel).

REFERENCES

1. Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, et al. (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76: 5974–5984.
2. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, et al. (2003) Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77: 5487–5492. doi:10.1128/JVI.77.9.5487-5492.2003.
3. Rouillé Y, Helle F, Delgrange D, Roingeard P, Voisset C, et al. (2006) Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol* 80: 2832–2841. doi:10.1128/JVI.80.6.2832-2841.2006.
4. Wölk B, Büchele B, Moradpour D, Rice CM (2008) A dynamic view of hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* 82: 10519–10531. doi:10.1128/JVI.00640-08.
5. Ferraris P, Blanchard E, Roingeard P (2010) Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *Journal of General Virology* 91: 2230–2237. doi:10.1099/vir.0.022186-0.
6. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, et al. (2012) Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* 8: e1003056. doi:10.1371/journal.ppat.1003056.
7. Ferraris P, Beaumont E, Uzbekov R, Brand D, Gaillard J, et al. (2013) Sequential biogenesis of host cell membrane rearrangements induced by hepatitis C virus infection. *Cell Mol Life Sci* 70: 1297–1306. doi:10.1007/s00018-012-1213-0.
8. Targett-Adams P, Boulant S, McLauchlan J (2008) Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 82: 2182–2195. doi:10.1128/JVI.01565-07.
9. Ivashkina N, Wölk B, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, et al. (2002) The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol* 76: 13088–13093.
10. Stone M, Jia S, Heo WD, Meyer T, Konan KV (2007) Participation of rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery. *J Virol*

81: 4551–4563. doi:10.1128/JVI.01366-06.

11. Berger KL, Cooper JD, Heaton NS, Yoon R, Oakland TE, et al. (2009) Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 7577–7582. doi:10.1073/pnas.0902693106.
12. Tai AW, Benita Y, Peng LF, Kim S-S, Sakamoto N, et al. (2009) A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* 5: 298–307. doi:10.1016/j.chom.2009.02.001.
13. Vaillancourt FH, Pilote L, Cartier M, Lippens J, Liuzzi M, et al. (2009) Identification of a lipid kinase as a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* 387: 5–10. doi:10.1016/j.virol.2009.02.039.
14. Borawski J, Troke P, Puyang X, Gibaja V, Zhao S, et al. (2009) Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *J Virol* 83: 10058–10074. doi:10.1128/JVI.02418-08.
15. Trotard M, Lepere-Douard C, Regeard M, Piquet-Pellorce C, Lavillette D, et al. (2009) Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening. *The FASEB Journal* 23: 3780–3789. doi:10.1096/fj.09-131920.
16. Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, et al. (2011) Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* 9: 32–45. doi:10.1016/j.chom.2010.12.002.
17. Ahn J, Chung K-S, Kim D-U, Won M, Kim L, et al. (2004) Systematic identification of hepatocellular proteins interacting with NS5A of the hepatitis C virus. *J Biochem Mol Biol* 37: 741–748.
18. Berger KL, Kelly SM, Jordan TX, Tartell MA, Randall G (2011) Hepatitis C Virus Stimulates the Phosphatidylinositol 4-Kinase III Alpha-Dependent Phosphatidylinositol 4-Phosphate Production That Is Essential for Its Replication. *J Virol* 85: 8870–8883. doi:10.1128/JVI.00059-11.
19. Goueslain L, Alsaleh K, Horellou P, Roingeard P, Descamps V, et al. (2010) Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 84: 773–787. doi:10.1128/JVI.01190-09.
20. Matto M, Sklan EH, David N, Melamed-Book N, Casanova JE, et al. (2011) Role for ADP Ribosylation Factor 1 in the Regulation of Hepatitis C Virus Replication. *J Virol* 85: 946–956. doi:10.1128/JVI.00753-10.
21. Zhang L, Hong Z, Lin W, Shao R-X, Goto K, et al. (2012) ARF1 and GBF1 Generate a PI4P-Enriched Environment Supportive of Hepatitis C Virus Replication. *PLoS ONE* 7: e32135. doi:10.1371/journal.pone.0032135.t001.
22. Bonifacino JS, Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion.

Cell 116: 153–166.

23. Donaldson JG, Jackson CL (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 362–375. doi:10.1038/nrm3117.
24. Guo Y, Walther TC, Rao M, Stuurman N, Goshima G, et al. (2008) Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature* 453: 657–661. doi:10.1038/nature06928.
25. Beller M, Sztalryd C, Southall N, Bell M, Jäckle H, et al. (2008) COPI complex is a regulator of lipid homeostasis. *PLoS Biol* 6: e292. doi:10.1371/journal.pbio.0060292.
26. Ellong EN, Soni KG, Bui QT, Sougrat R, Golinelli-Cohen M-P, et al. (2011) Interaction between the triglyceride lipase ATGL and the Arf1 activator GBF1. *PLoS ONE* 6: e21889. doi:10.1371/journal.pone.0021889.
27. Belov GA, Feng Q, Nikovics K, Jackson CL, Ehrenfeld E (2008) A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog* 4: e1000216. doi:10.1371/journal.ppat.1000216.
28. Verheije MH, Raaben M, Mari M, Lintelo te EG, Reggiori F, et al. (2008) Mouse hepatitis coronavirus RNA replication depends on GBF1-mediated ARF1 activation. *PLoS Pathog* 4: e1000088. doi:10.1371/journal.ppat.1000088.
29. Lanke K, van der Schaar H, Belov G, Feng Q, Duijsings D, et al. (2009) GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for coxsackievirus B3 RNA replication. *J Virol*. doi:10.1128/JVI.01244-09.
30. Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, et al. (1994) Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 68: 6147–6160.
31. Macdonald A, Crowder K, Street A, McCormick C, Saksela K, et al. (2003) The hepatitis C virus non-structural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling. *J Biol Chem* 278: 17775–17784. doi:10.1074/jbc.M210900200.
32. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42: 3858–3863.
33. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, et al. (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11: 791–796. doi:10.1038/nm1268.
34. Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouillé Y, et al. (2007) Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol* 88: 2495–2503. doi:10.1099/vir.0.82872-0.

35. Rocha-Perugini V, Montpellier C, Delgrange D, Wychowski C, Helle F, et al. (2008) The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE* 3: e1866. doi:10.1371/journal.pone.0001866.
36. Alsaleh K, Delavalle P-Y, Pillez A, Duverlie G, Descamps V, et al. (2010) Identification of basic amino acids at the N-terminal end of the core protein that are crucial for hepatitis C virus infectivity. *J Virol* 84: 12515–12528. doi:10.1128/JVI.01393-10.
37. Snooks MJ, Bhat P, Mackenzie J, Counihan NA, Vaughan N, et al. (2008) Vectorial entry and release of hepatitis A virus in polarized human hepatocytes. *J Virol* 82: 8733–8742. doi:10.1128/JVI.00219-08.
38. Niu T-K, Pfeifer AC, Lippincott-Schwartz J, Jackson CL (2005) Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol Biol Cell* 16: 1213–1222. doi:10.1091/mbc.E04-07-0599.
39. Hunziker W, Whitney JA, Mellman I (1991) Selective inhibition of transcytosis by brefeldin A in MDCK cells. *Cell* 67: 617–627.
40. Wagner M, Rajasekaran AK, Hanzel DK, Mayor S, Rodriguez-Boulan E (1994) Brefeldin A causes structural and functional alterations of the trans-Golgi network of MDCK cells. *J Cell Sci* 107 (Pt 4): 933–943.
41. Misumi Y, Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, et al. (1986) Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 261: 11398–11403.
42. Claude A, Zhao B, Melançon P (2003) Characterization of alternatively spliced and truncated forms of the Arf guanine nucleotide exchange factor GBF1 defines regions important for activity. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 160–169.
43. Bui QT, Golinelli-Cohen M-P, Jackson CL (2009) Large Arf1 guanine nucleotide exchange factors: evolution, domain structure, and roles in membrane trafficking and human disease. *Mol Genet Genomics* 282: 329–350. doi:10.1007/s00438-009-0473-3.
44. Renault L, Guibert B, Cherfils J (2003) Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* 426: 525–530. doi:10.1038/nature02197.
45. Mossessova E, Corpina RA, Goldberg J (2003) Crystal Structure of ARF1•Sec7 Complexed with Brefeldin A and Its Implications for the Guanine Nucleotide Exchange Mechanism. *Mol Cell* 12: 1403–1411. doi:10.1016/S1097-2765(03)00475-1.
46. Peyroche A, Antonny B, Robineau S, Acker J, Cherfils J, et al. (1999) Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* 3: 275–285.
47. Citterio C, Vichi A, Pacheco-Rodriguez G, Aponte AM, Moss J, et al. (2008)

- Unfolded protein response and cell death after depletion of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein GBF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2877–2882. doi:10.1073/pnas.0712224105.
48. Chia J, Goh G, Racine V, Ng S, Kumar P, et al. (2012) RNAi screening reveals a large signaling network controlling the Golgi apparatus in human cells. *Mol Syst Biol* 8: 629. doi:10.1038/msb.2012.59.
 49. Szul T, Grabski R, Lyons S, Morohashi Y, Shestopal S, et al. (2007) Dissecting the role of the ARF guanine nucleotide exchange factor GBF1 in Golgi biogenesis and protein trafficking. *J Cell Sci* 120: 3929–3940. doi:10.1242/jcs.010769.
 50. Sáenz JB, Sun WJ, Chang JW, Li J, Bursulaya B, et al. (2009) Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function. *Nat Chem Biol* 5: 157–165. doi:10.1038/nchembio.144.
 51. Boal F, Guetzoyan L, Sessions RB, Zeghouf M, Spooner RA, et al. (2010) LG186: An Inhibitor of GBF1 Function that Causes Golgi Disassembly in Human and Canine Cells. *Traffic* 11: 1537–1551. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01122.x.
 52. Boal F, Stephens DJ (2010) Specific functions of BIG1 and BIG2 in endomembrane organization. *PLoS ONE* 5: e9898. doi:10.1371/journal.pone.0009898.
 53. Belov GA, Kovtunovych G, Jackson CL, Ehrenfeld E (2010) Poliovirus replication requires the N-terminus but not the catalytic Sec7 domain of ArfGEF GBF1. *Cell Microbiol*. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01482.x.
 54. Belov GA, Altan-Bonnet N, Kovtunovych G, Jackson CL, Lippincott-Schwartz J, et al. (2007) Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA. *J Virol* 81: 558–567. doi:10.1128/JVI.01820-06.
 55. Hsu N-Y, Ilnytska O, Belov G, Santiana M, Chen Y-H, et al. (2010) Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* 141: 799–811. doi:10.1016/j.cell.2010.03.050.
 56. Dumaresq-Doiron K, Savard M-F, Akam S, Costantino S, Lefrancois S (2010) The phosphatidylinositol 4-kinase PI4KIIIalpha is required for the recruitment of GBF1 to Golgi membranes. *J Cell Sci* 123: 2273–2280. doi:10.1242/jcs.055798.
 57. Sklan EH, Serrano RL, Einav S, Pfeffer SR, Lambright DG, et al. (2007) TBC1D20 is a Rab1 GTPase-activating protein that mediates hepatitis C virus replication. *J Biol Chem* 282: 36354–36361. doi:10.1074/jbc.M705221200.
 58. Sklan EH, Staschke K, Oakes TM, Elazar M, Winters M, et al. (2007) A Rab-GAP TBC domain protein binds hepatitis C virus NS5A and mediates viral replication. *J Virol* 81: 11096–11105. doi:10.1128/JVI.01249-07.
 59. Nevo-Yassaf I, Yaffe Y, Asher M, Ravid O, Eizenberg S, et al. (2012) A role for

TBC1D20 and Rab1 in Hepatitis C virus replication via interaction with LD bound NS5A. *J Virol.* doi:10.1128/JVI.00496-12.

60. Monetta P, Slavin I, Romero N, Alvarez C (2007) Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Mol Biol Cell* 18: 2400–2410. doi:10.1091/mbc.E06-11-1005.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Viability of BFA-resistant cells. Sub-confluent cells of the indicated cell lines were cultured in 96-well plates in the presence of the indicated concentrations of BFA or of 0.2% ethanol (BFA stock solvent) for 24 h. Viability was assessed using an MTS assay. The absorbance of the ethanol-treated sample is expressed as 100%. Results were expressed as percentages of the values obtained with no BFA. Error bars represent the SEM of 2 independent experiments performed in triplicates.

Figure 2. HCV infection in BFA-resistant cells. Cells of the indicated cell lines were infected for 2 h with HCVcc expressing a *Renilla* luciferase in the presence of the indicated concentrations of BFA. The virus was removed and the cells were left in the presence of BFA for another 6-h period. Cells were lysed in *Renilla* lysis buffer at 24 hpi, and the luciferase activity was quantified as a measure of HCV infection. Results were expressed as percentages of the values obtained with no BFA. Error bars represent the SD of 3 experiments performed in triplicates. +, values below 0.1%.

Figure 3. Impact of GBF1 and Arf1 depletion on HCV replication in R1 and R2 cells. (A) Cells of the indicated cell lines were transfected with siRNA targeting GBF1, BIG1, or PI4KIII α (PI4KA), and infected with HCVcc. Cells were lysed at 30 hpi and the expression of NS5A, GBF1, and β -tubulin were analyzed by immunoblotting. (B) For each cell line, NS5A expression is expressed as a percentage of the values obtained for mock-transfected cells. (C) Cells of the indicated cell lines were transfected with siRNA targeting Arf1 or PI4KIII α (PI4KA), or with a non-targeting control siRNA, and infected with HCVcc. Cells were lysed at 30 hpi and the expression of NS5A, Arf1, and β -tubulin were analyzed by immunoblotting. (D) For each cell line, NS5A expression is expressed as a percentage of the values obtained for the control siRNA. Error bars represent the SD of 3 independent experiments. +, NS5A below the detection limit.

Figure 4. Serum albumin and apolipoprotein E secretion in BFA-resistant cells. (A) Albumin secretion. Cells of the indicated cell lines were seeded in 12-well plates,

and cultured in the presence of BFA for 24 h. The amounts of human serum albumin (HSA) in the conditioned culture media and in cell lysates were quantified with an ELISA assay and expressed as percentages of HSA secretion. Error bars represent the SEM of 4 independent experiments performed in duplicates. (B) Basal HSA expression levels. HSA of the indicated cell lines were quantified from cell lysates (in the absence of BFA treatment) by ELISA and normalized to the total protein concentration. (C) Apolipoprotein E (apoE) secretion. Cells were cultured in 24-well plates, in the presence of the indicated concentrations of BFA for 8 h. The amounts of apoE in cell lysates and culture media and of tubulin in cell lysates were analyzed by immunoblotting. Error bars represent the SEM of 3 independent experiments.

Figure 5. Mutation detected in GBF1 of R1 and R2 cells. (A) A fraction of the electrophoregrams corresponding to the sequence of GBF1 from the indicated cell lines is presented. The nucleotide and amino-acid sequences are indicated. The position of the mutation is indicated by an arrow. (B) Huh-7 cells were transfected with expression plasmids for GBF1-M832L, GBF1 inactive mutant E794K, or YFP. Transfected cells were submitted to a cell viability assay, as explained in the legend of figure 1. Results were expressed as percentages of the values obtained with no BFA. Error bars represent the SEM of 3 independent experiments performed in triplicates. (C) Transfected cells were seeded in 12-well plates, and cultured in the presence of BFA for 24 h. The amounts of human serum albumin (HSA) in the conditioned culture media and in cell lysates were quantified with an ELISA assay and expressed as percentages of HSA secretion. Error bars represent the SEM of 3 independent experiments performed in duplicates

Figure 6. Morphology of BFA-sensitive compartments of R1 and R2 cells. Cells of the indicated cell lines were treated with 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (A) or 5 $\mu\text{g/ml}$ (B, C) BFA for 30 minutes, fixed and processed for the immunofluorescent detection of GM130 (A), TGN46 (B), or the transferrin receptor (C). The nuclei were stained with DAPI. Representative confocal images are presented. Bar, 20 μm .

Figure 7. BFA sensitivity of the cis-Golgi of Huh-7, R1, R2 and MDCK cells.

Cells were treated for 30 minutes with increasing concentrations of BFA, fixed and processed for the immunofluorescent detection of GM130. For each condition,

approximately 100 cells were scored for their cis-Golgi morphology, as either intact or scattered. For each cell line, the percentages of cells with intact cis-Golgi morphology were plotted against BFA concentrations

Figure 8. Immunoblot analysis of GBF1 and Arf1 expression in R1 and R2 cells. Equal amounts of lysates of the indicated cell lines were analyzed by immunoblotting for the expression of GBF1, Arf1 and β -tubulin

Figure 9. Impact of Arf-GEF depletion on the cis-Golgi morphology. Huh-7 cells were transfected with siRNA targeting GBF1, BIG1, BIG2, or both BIG1 and BIG2. Cells were fixed 3 days after transfection and processed for the immunofluorescent detection of GM130 (shown in red). The nuclei were stained with DAPI (shown in blue). Representative confocal images are presented. Bar, 20 μ m.

Table 1 Selection of BFA-resistant cell lines

Cell line	Cell source	BFA (ng/ml)
R1	Huh-7	40
R2	Huh-7	100
R3	Huh-7	100
R4	Huh-7	50
R5	Huh-7	100
R6	Huh-7	100
R7	Huh-7	100

Table 2 Mutations found in the coding sequence of GBF1 in Huh-7 cells

Reference sequence ^a		Amino acid sequence	
Position	Mutation	Position	Residue
1933	T/A	547	Tyr/Asn
4480	C/A	1396	Leu/Met
5469	G/T	1725	Glu/Asp
5791	G/A	1833	Ala/Thr

^a Genbank NM_001199379.1

Table 3 Half maximal effective concentrations of BFA effects on the cis-Golgi morphology and HSA secretion

Cell line	Golgi morphology EC₅₀ (ng/ml)	HSA secretion EC₅₀ (ng/ml)
Huh-7	12	60
R1	280	>10000
R2	180	≈10000
MDCK	8500	ND

SUPPORTING INFORMATION LEGENDS

Table S1. Primers used for GBF1 sequencing

Figure S1. BFA does not inhibit HCV replication in R1 and R2 cells. Huh-7 cells (A), R1 cells (B), and R2 cells (C) were electroporated with HCVcc-Rluc/ Δ core or HCVcc-Rluc/GND RNA. HCVcc-Rluc/ Δ core-electroporated cells were incubated for 8 h in the presence of the indicated concentrations of BFA. Cells were lysed in *Renilla* lysis buffer at indicated time points post-electroporation, and the luciferase activity was quantified as a measure of HCV replication. Results were normalized to the values obtained at 4 hpi with no BFA.

Figure S2. Impact of BFA on the cis-Golgi morphology of MDCK cells. MDCK cells were treated for 30 minutes with the indicated concentrations of BFA, fixed and processed for the immunofluorescent detection of GM130 (shown in red). The nuclei were stained with DAPI (shown in blue). Representative confocal images are presented. Bar, 20 μ m.

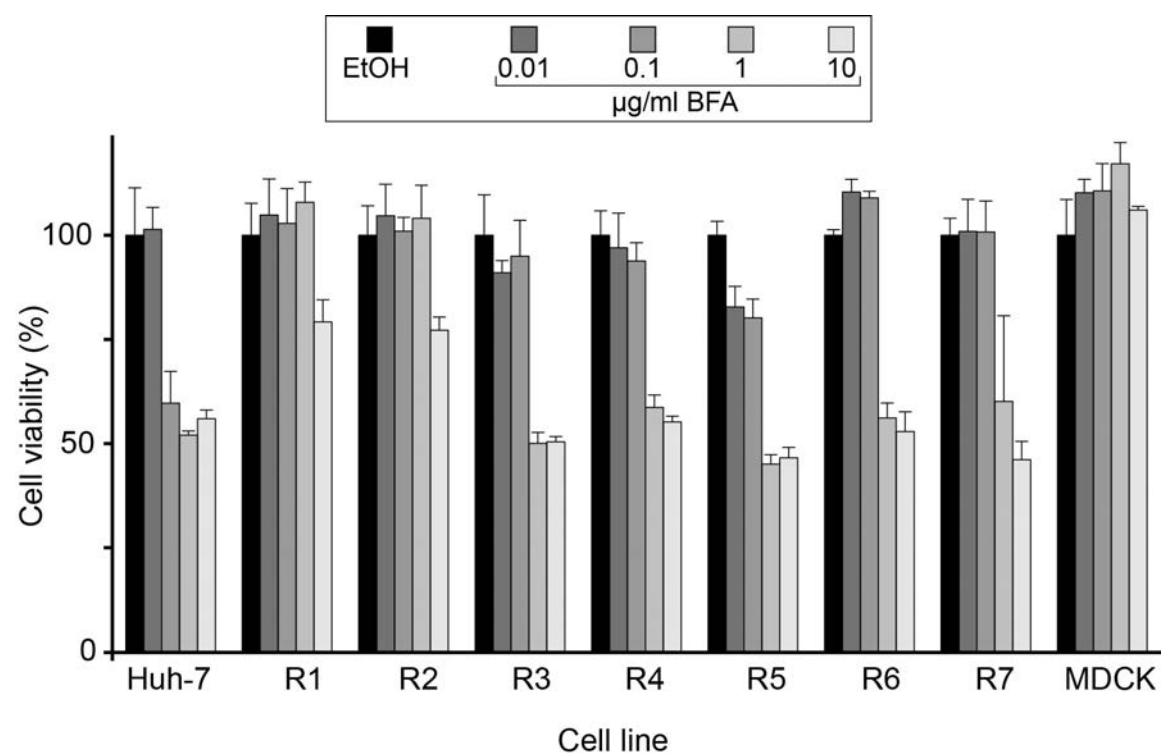


Fig 1

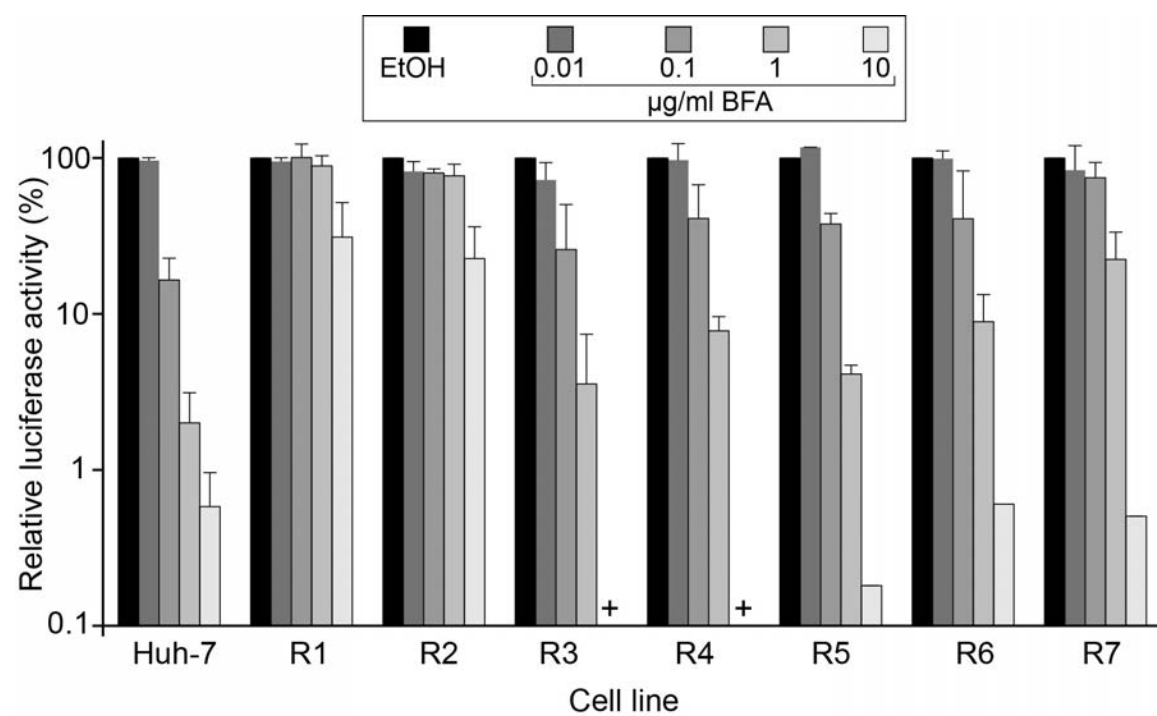


Fig 2

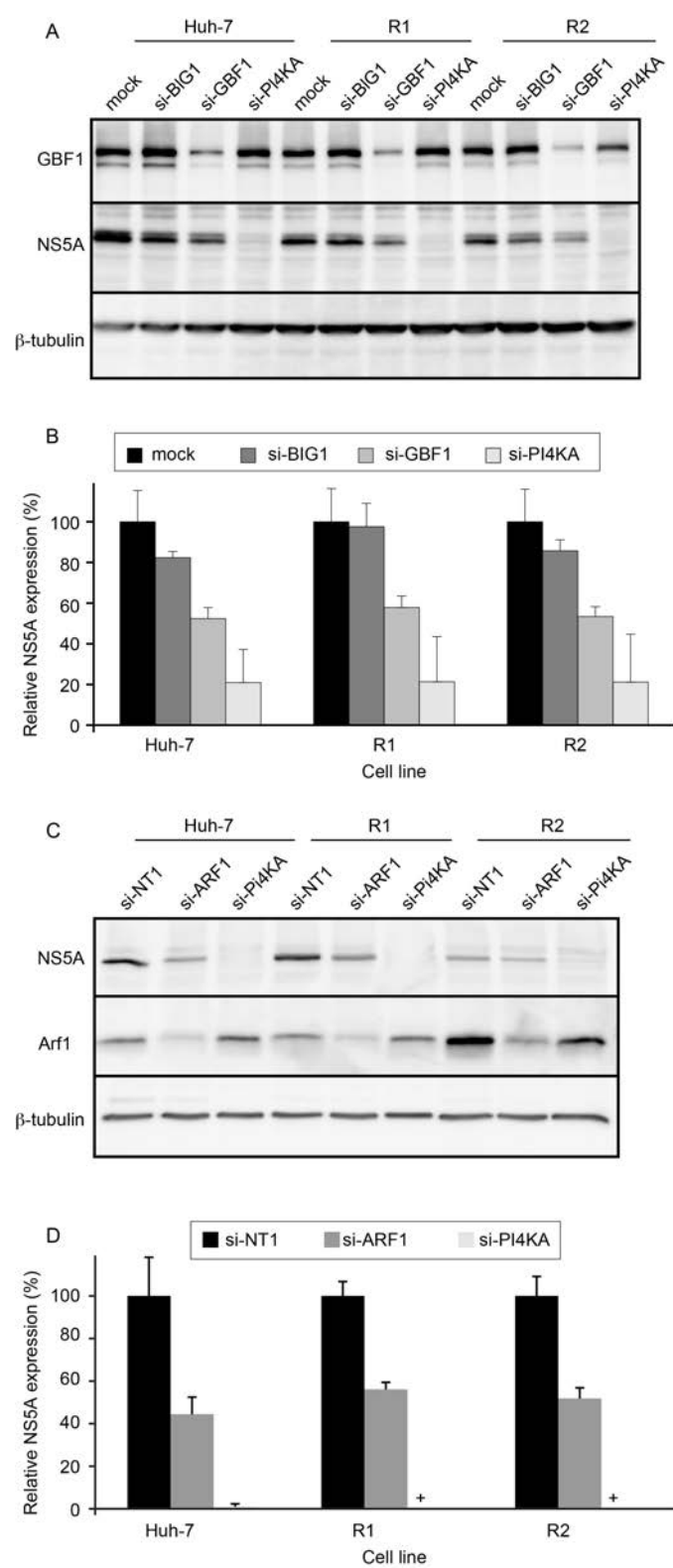


Fig 3

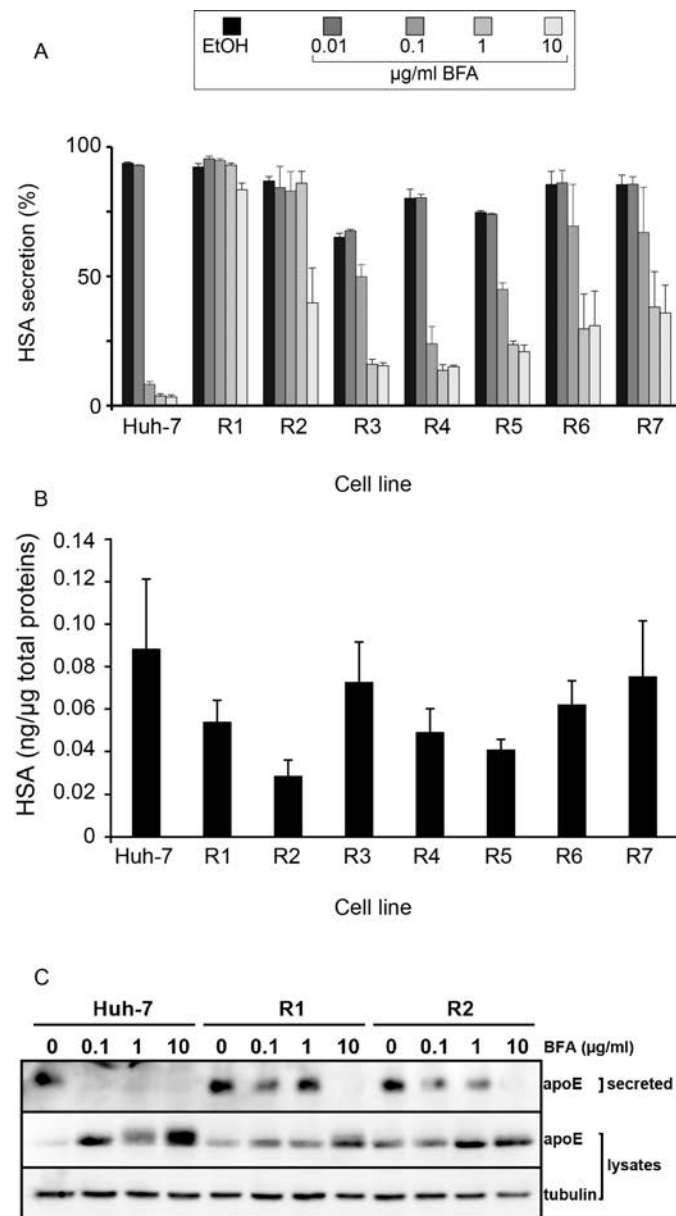
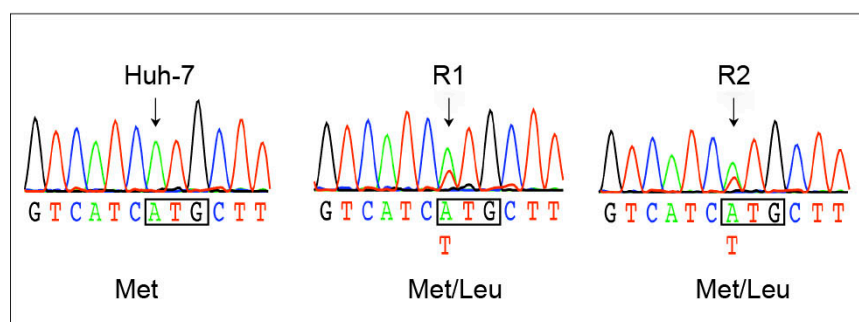
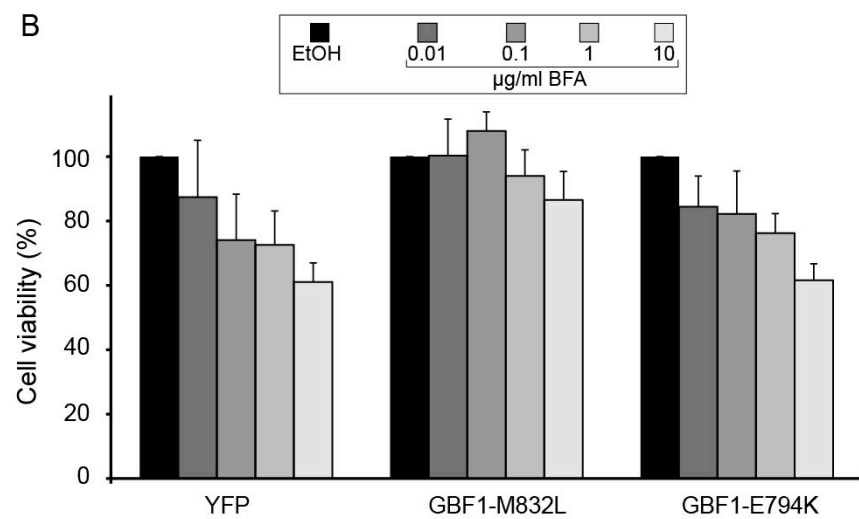


Fig 4

A



B



C

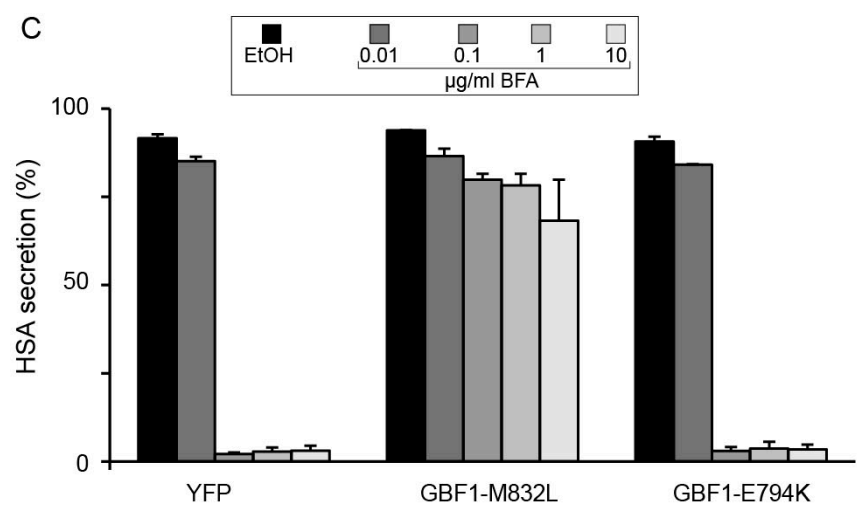


Fig 5

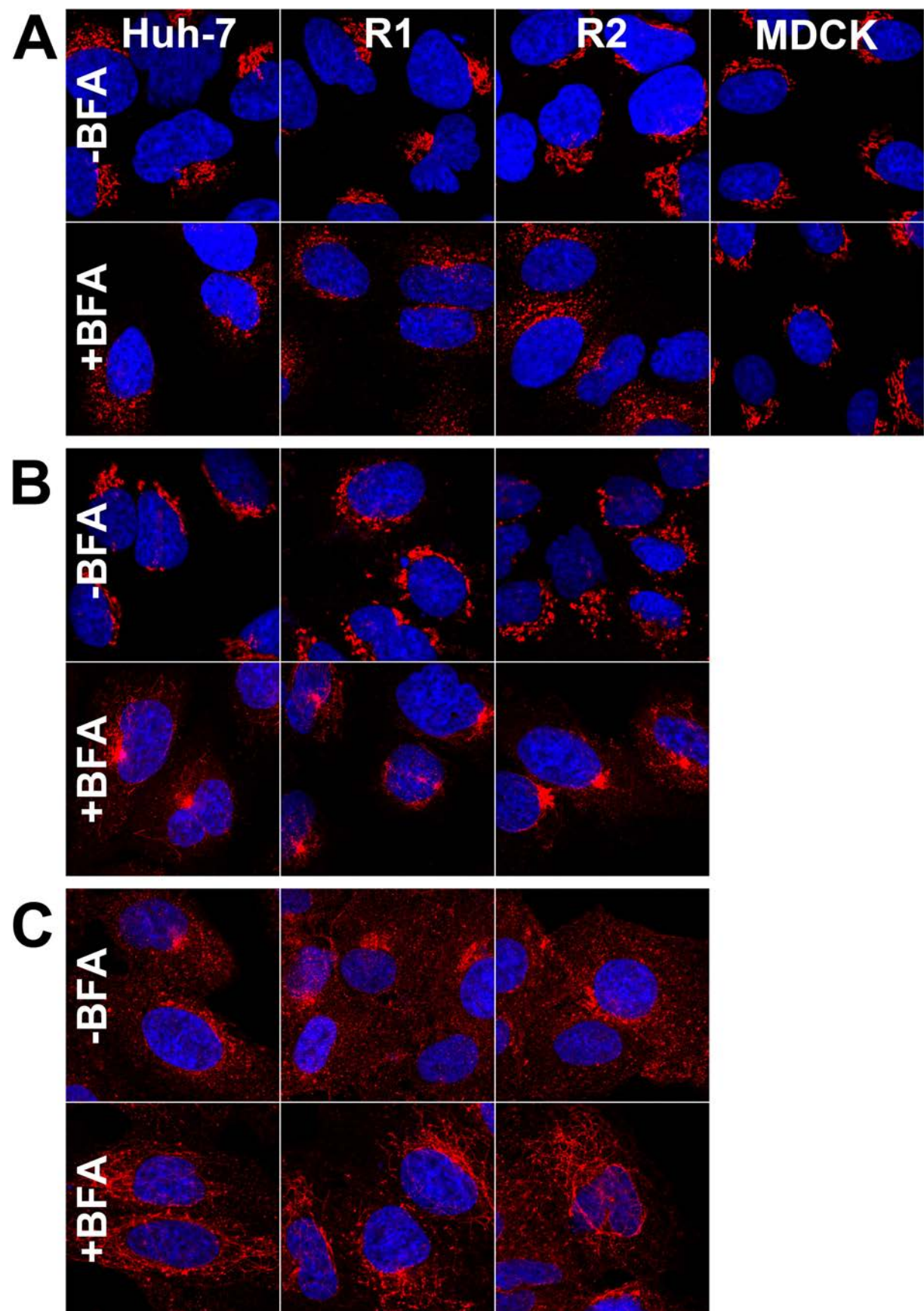


Fig 6

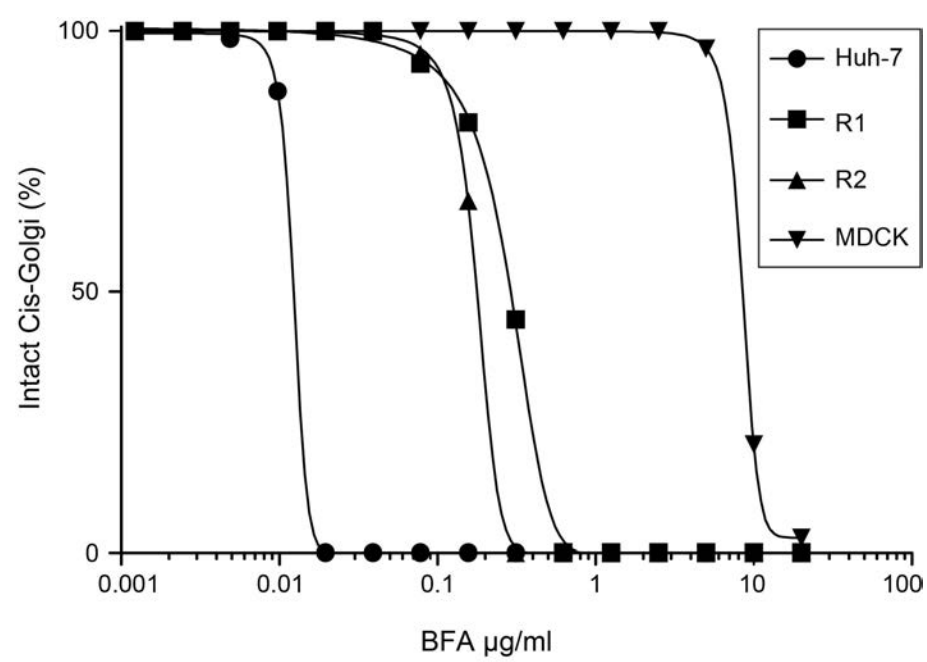


Fig 7

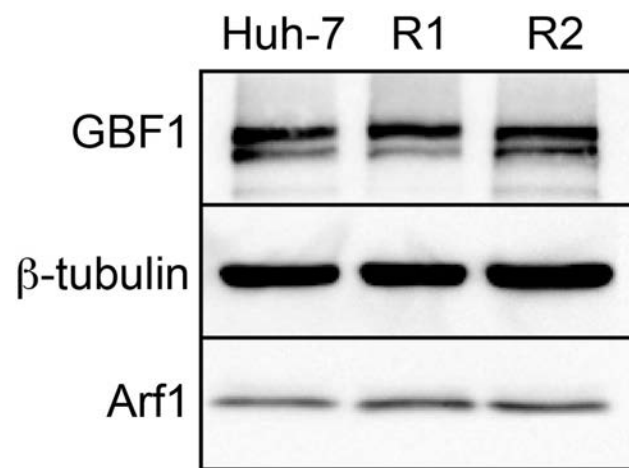


Fig 8

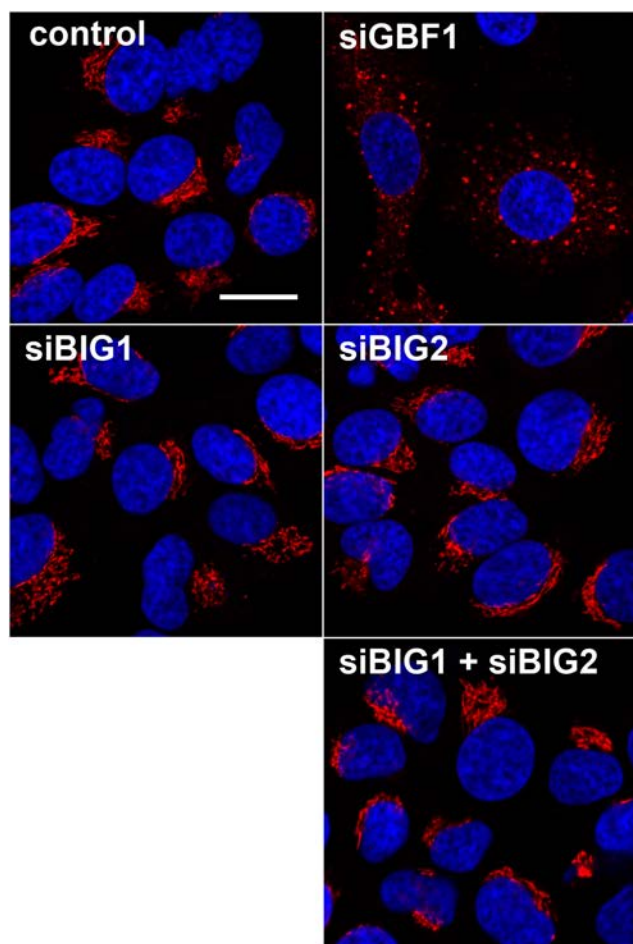


Fig 9

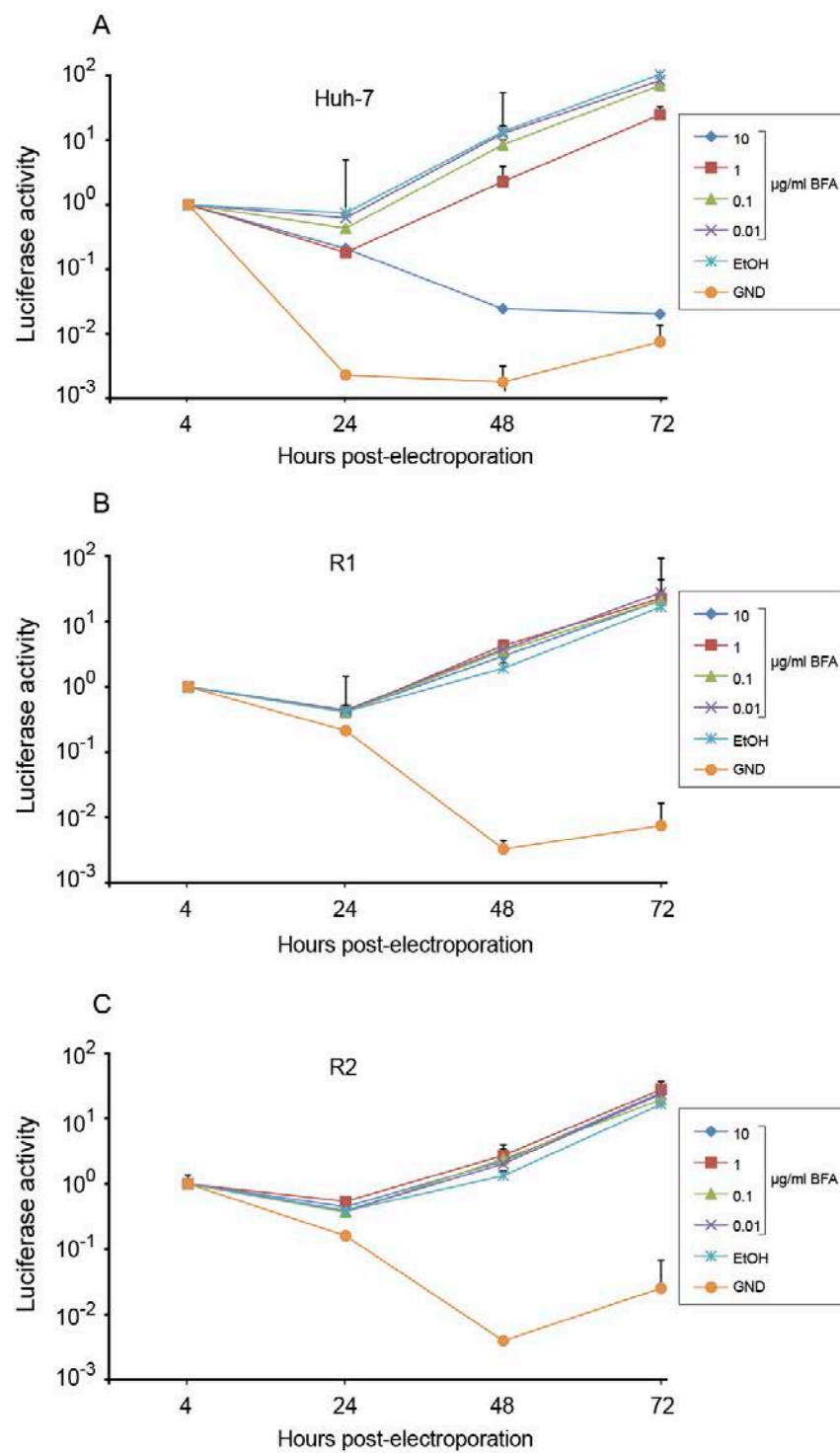


Fig S1

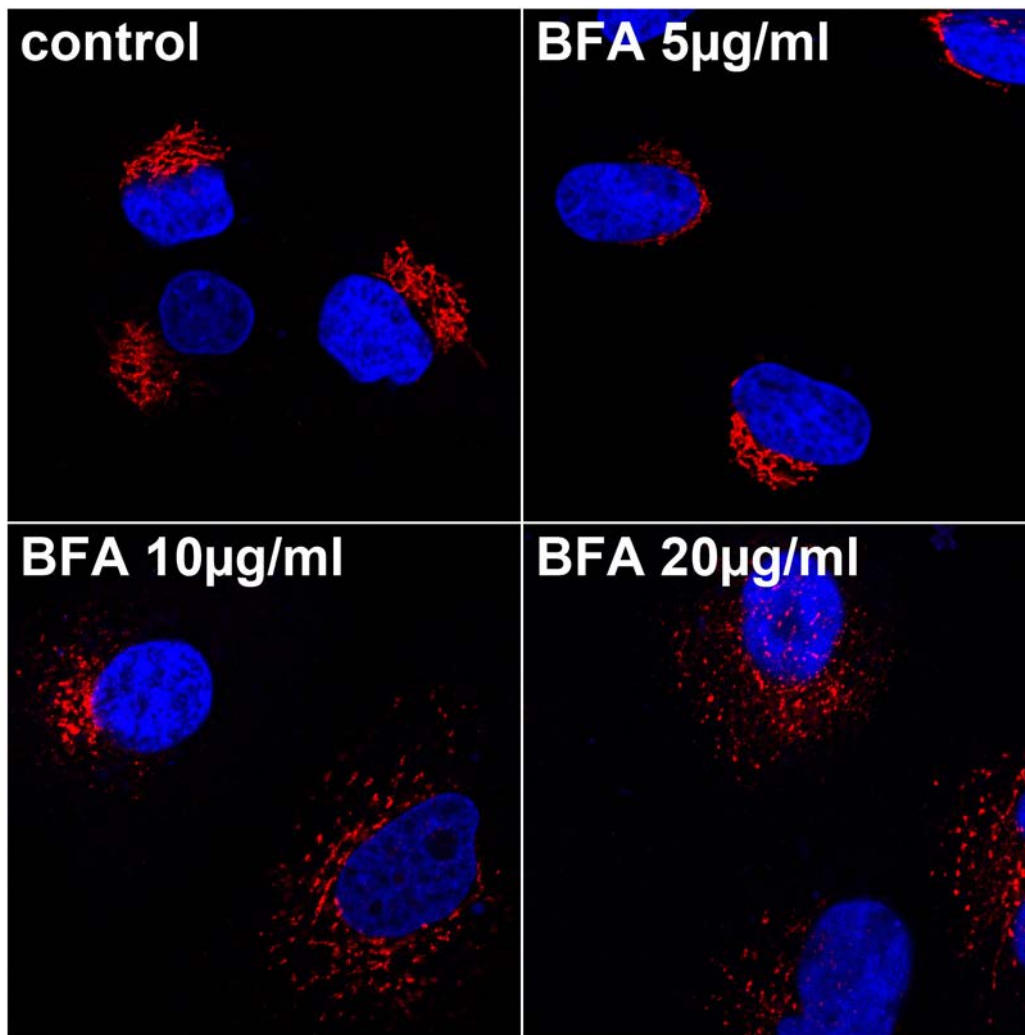


Fig S2

2eme partie

GBF1 est le facteur cellulaire sensible à la BFA et nécessaire à la réplication de HCV. Son rôle pendant l'étape de réplication de HCV n'est pas connu. Il n'est pas nécessaire pour la formation des remaniements membranaires qui sont le siège de la réplication mais semble être nécessaire pour une étape de maturation de ces membranes ou semble intervenir pendant leur fonctionnement. GBF1 n'est pas composant des complexes de réplication de HCV (Goueslain *et al.*, 2010). Aucune interaction entre GBF1 avec les protéines virales n'a été observée jusqu'à présent. Ces données suggèrent que GBF1 semble réguler la réplication de HCV en activant une protéine G de la famille Arf qui serait responsable du recrutement des effecteurs de la réplication. L'objectif principal de ce travail serait d'identifier le mécanisme par lequel GBF1 régule la réplication de HCV.

GBF1 est un facteur d'échange nucléotidique des protéines G de la famille Arf de 206 kDa environ contenant plusieurs domaines. Son domaine catalytique *sec7* contient des motifs conservés qui interagissent avec les protéines G de la famille Arf. Bien que GBF1 soit nécessaire à l'infection par le PV, son domaine catalytique *sec7* n'est pas indispensable (Belov *et al.*, 2010). Nous avons étudié le rôle du domaine *sec7*, régulateur des protéines Arf, pendant l'infection HCV. Pour cela nous avons exprimé les mutants de délétion de GBF1 dont un mutant ne contenant pas le domaine *sec7*. L'infection en présence de BFA montre que seule la surexpression du GBF1 sauvage ou du mutant de résistance à la BFA (M832L) complémente l'inhibition de l'infection HCV par la BFA. Des résultats semblables de complémentations ont été observés lors de l'étude de la voie de sécrétion en quantifiant l'albumine sérique humaine (HSA) (voie régulée par l'activité GEF de GBF1), suggérant que l'activité catalytique de ce domaine est indispensable à l'infection HCV et donc que l'infection HCV fait intervenir au moins une protéine de la famille Arf.

Nous avons ensuite analysé l'implication de ArfGAP1, protéine régulatrice des Arf, qui catalyse l'hydrolyse du GTP et par conséquent le recyclage de Arf à l'état inactif. L'infection en présence d'un inhibiteur de ArfGAP1 (QS11) montre une diminution dose dépendante de l'infection HCV. Cette diminution résulte d'un effet sur la réplication de HCV suggérant ainsi que ArfGAP1, comme GBF1, agit en régulant l'activité des protéines Arf pendant l'infection HCV. Ces résultats suggèrent un rôle d'une protéine Arf pendant l'infection HCV

Plusieurs études montrent un rôle de Arf1 pendant l'infection HCV (Matto *et al.*, 2010) (Zhang *et al.*, 2012) (Farhat *et al.*, 2013). L'expression de 2 dominants négatifs de Arf1 ; les formes constitutivement inactive (mutant T31N restreint à la liaison du GDP) et constitutivement active (mutant Q71L restreint à la liaison du GTP) bloque l'infection HCV. Ce blocage confirme l'implication d'une ou de plusieurs Arf pendant l'infection HCV. Ce résultat indique que la fonctionnalité de la voie est essentielle pendant l'infection et non pas seulement la présence de la forme Arf-GTP capable de recruter les effecteurs.

La famille des protéines Arf contient plusieurs 6 Arf et des Arl (Arf-like). Nous avons analysé l'effet des Arf exprimées dans les cellules Huh-7 et inhibées par la BFA pendant l'infection HCV. Les différents gènes d'intérêts (Arf1, Arf3, Arf4 et Arf5) ont été ciblés par une interférence à l'ARN. L'infection dans ces cellules montre une faible réduction de l'infection HCV (environ 25%) pour la déplétion indépendante de chacune des 4 Arf. En vérifiant l'efficacité de déplétion, nous avons observé une augmentation de l'expression de Arf4 dans les cellules déplétées en Arf1. Ce phénomène de compensation entre ces 2 protéines pourrait être due à un effet de redondance. En 2005, l'action en paire de ces 2 protéines a été suggérée (référence Voplicelli-Daley à insérer). Afin de contourner ce phénomène de compensation, nous avons ciblé par interférence à l'ARN les protéines Arf par paires en utilisant toutes les combinaisons possibles. De manière intéressante, la déplétion des Arf 4 et 5 (classe II) inhibe fortement l'infection HCV comparé aux autres paires d'Arf. Cette inhibition de l'infection HCV se fait au niveau de l'étape de réplication. Nous avons ensuite regardé la localisation cellulaire des Arf4 et Arf5, d'une manière intéressante Arf4 et Arf5 colocalisent avec GBF1 au niveau du cis-Golgi dans une cellule naïve. La déplétion de Arf4 et Arf5 induit une accumulation des gouttelettes lipidiques dans la périphérie de la cellule (phénotype aussi observé avec le traitement BFA et la déplétion de GBF1).

La déplétion en Arf4 et Arf5 n'a pas d'effet sur la sécrétion d'albumine ou d'apoE et ne se traduit pas par une fragmentation du Golgi. En revanche, la déplétion de Arf1 et Arf4, qui n'a pas d'effet sur l'infection HCV, induit une fragmentation du cis-Golgi et une inhibition de la sécrétion. Ces résultats indiquent que GBF1 semble activer au moins 2 paires d'Arf, la première (Arf1 et Arf4) pour réguler des mécanismes cellulaires de la voie de sécrétion ; la deuxième Arf4 et Arf5 qui est nécessaire à l'infection HCV et qui agit probablement par un effet sur le métabolisme lipidique dans la cellule (changement de

la morphologie des gouttelettes) qui semble être en lien étroit avec la réplication de HCV.

Les résultats de cette partie font l'objet d'un manuscrit en préparation intitulé :

Identification of class II ADP-ribosylation factors as a cellular factors required for HCV replication

Identification of class II ADP-ribosylation factors as a cellular factors required for HCV replication

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) is a positive-sense single-stranded RNA virus of the *Flaviviridae* family (Lindenbach *et al.*, 2007). Like other positive RNA viruses, HCV genome is replicated in the cytoplasm of its host cell, which is the human hepatocyte. During HCV replication, internal membranes of the cell are rearranged and these rearranged membranes likely are replication sites of the viral RNA genome. HCV-induced membrane rearrangements have been named membranous web (Egger *et al.*, 2002). They include double membrane vesicles (DMV) and clusters of small single membrane vesicles of ER origin (Ferraris *et al.*, 2010; Romero-Brey *et al.*, 2012). DMV have also been observed in cells replicating RNA viruses of other families, including *Picornaviridae* (Limpens *et al.*, 2011; Belov *et al.*, 2012) and *Coronaviridae* (Knoops *et al.*, 2008; Ulasli *et al.*, 2010), but not with other viruses of the *Flaviviridae* family (Welsch *et al.*, 2009; Gillespie *et al.*, 2010). The exact functions and the mechanisms leading to their formation are still poorly understood.

GBF1, a major regulator of membrane dynamics in the early secretory pathway, has recently emerged as a host factor involved in the replication of several viruses of the *Picornaviridae* (Belov *et al.*, 2008; Lanke *et al.*, 2009), *Coronaviridae* (Verheije *et al.*, 2008), and *Flaviviridae* (Goueslain *et al.*, 2010; Carpp *et al.*, 2014) families. GBF1 is a brefeldin A (BFA)-sensitive guanine nucleotide exchange factor (GEF) of G-proteins of the Arf family. Arfs recruit and activate a number of effectors, which function in vesicular transport, phospholipids metabolism and actin cytoskeleton regulation (Donaldson and Jackson, 2011; Wright *et al.*, 2014). There are 6 Arfs in mammalian cells, which are grouped into three classes based on sequence homology. Class I contains Arf1-3, class II contains Arf4 and Arf5, and Arf6 constitutes the sole member of class III (Donaldson and Jackson, 2011; Wright *et al.*, 2014). As an ArfGEF, GBF1 shows selectivity for Arfs of classes I and II (Claude *et al.*, 1999; Szul *et al.*, 2007). GBF1 is a large protein of 206 kDa containing 6 conserved domains (Bui *et al.*, 2009). The GEF activity is catalyzed by the Sec7 domain. Our knowledge of the functions of the other conserved domains is still minimal.

The mechanism of action of GBF1 in viral infection is not yet fully understood. It is generally assumed to function as an ArfGEF by activating Arf1, which in turn would recruit the COP-I coatomer, molecular machinery involved in intracellular transport, which has also been shown to be required for the replication of several positive RNA

viruses (Gazina *et al.*, 2002; Cherry *et al.*, 2006; Tai *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Therefore, a GBF1-Arf1-COP-I pathway has been proposed to play a role in the replication of HCV (Zhang *et al.*, 2012; Farhat *et al.*, 2013) and other viruses (Wang *et al.*, 2014). However, a direct functional link between GBF1 activation and COP-I function in the replication of HCV and other viruses has not been experimentally demonstrated, and GBF1 may as well primarily function by activating other cellular effectors essential for the viral replication. Indeed, the activation of another Arf1 effector, the phosphatidylinositol 4-kinase III β , by GBF1 has also been proposed to be involved in HCV replication (Zhang *et al.*, 2012). However the involvement of this kinase during HCV replication is still controversial (Tai *et al.*, 2009; Vaillancourt *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2009; Borawski *et al.*, 2009; Trotard *et al.*, 2009). Other possibilities for GBF1 function during viral replication include the activation of other members of the Arf family or mechanisms unrelated to Arf activation. For example, the mechanism of action of GBF1 during poliovirus replication has been demonstrated not to depend on its catalytic Sec7 domain and therefore on its GEF activity (Belov *et al.*, 2010). In this study, we investigated the mechanism of action of GBF1 in HCV replication. Our data support a model in which GBF1 primarily functions by activating class II Arf proteins.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), phosphate-buffered saline (PBS), goat and fetal calf sera (FCS), BODIPY 493/503 and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were purchased from Life Technologies. Mowiol 3-88 was from Calbiochem. Protease inhibitor mix (Complete) was from Roche. QS11 was from Tocris. Other chemicals were from Sigma.

Antibodies. Mouse anti-E1 mAb A4 (Dubuisson *et al.*, 1994) was produced in vitro by using a MiniPerm apparatus (Heraeus) as recommended by the manufacturer. Mouse anti-NS5A mAb 9E10 (Lindenbach *et al.*, 2005) was kindly provided by C. M. Rice (The Rockefeller University). Mouse anti-CD71 (transferring receptor) mAb was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Sheep anti-TGN46 was from Serotec. Mouse anti-GBF1, anti-EEA1, and anti-GM130 mAbs were from Transduction Laboratories. Mouse anti- β -tubulin mAb (TUB 2.1) was from Sigma. Mouse anti-HSA (ZMHSA1) was from Invitrogen. Goat anti-HSA (507313) was from Calbiochem. Goat anti-ApoE was from Millipore. Alexa 555-conjugated donkey anti-sheep IgG antibody was from Invitrogen. Peroxidase-conjugated goat anti-mouse, and anti-sheep IgG, and cyanine 3-conjugated goat anti-mouse IgG were from Jackson ImmunoResearch.

Cell culture. Huh-7 (Nakabayashi *et al.*, 1982) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), high glucose modification, supplemented with glutamax-I and 10% FCS.

HCVcc. The virus JFH1-CSN6A4 used in this study was based on JFH1, and contained cell culture adaptive mutations (Delgrange *et al.*, 2007) and a reconstituted A4 epitope in E1, as previously described (Goueslain *et al.*, 2010). The plasmid pJFH1-CSN6A4 was linearized with XbaI and treated with the Mung Bean Nuclease (New England Biolabs). In vitro transcripts were generated using the Megascript kit according to the manufacturer's protocol (Ambion). Ten micrograms of in vitro transcribed RNA were delivered into Huh-7 cells by electroporation as described previously (Kato *et al.*, 2003). For virus production, electroporated cells were passaged 3 days after electroporation and grown to confluency. The culture medium was collected every day, titered, aliquoted and stored at -80°C. For infection assays, sub-confluent naïve Huh-7 cells grown in a P24 well were incubated with 50 μ l of this virus preparation diluted to 200 μ l of medium for 2 hours, and the inoculate was replaced with fresh culture medium.

Replication assay. The construct used for the replication assay (HCVcc-Rluc/ Δ core) was as previously described (Farhat *et al.*, 2013). A nonreplicative control contained a GND mutation in the NS5B active site, as previously reported (Wakita *et al.*, 2005). Huh-7 cells were electroporated with HCVcc-Rluc/ Δ core or HCVcRluc/GND RNA, and seeded in 24-well plates. The luciferase activity was measured 4 h, 24 h, 48 h and 72 h post-electroporation using the Renilla luciferase assay system kit from Promega. Luciferase activity at 4 hpi was expressed as 1 and the measures at other time points were normalized accordingly.

DNA transfections. Twenty-four hours before transfection, cells were seeded in 24-well clusters to reach 60-70% confluency the next day. Cells were transfected with 0.5 μ g of plasmid DNA mixed with Trans-IT LT1 reagent following the instructions of the manufacturer (Mirus).

Adenoviruses. A recombinant adenovirus expressing a green fluorescent protein (EGFP) was as previously described (Farhat *et al.*, 2013). Cells were infected for 1 hour at 37°C. Cells were fixed for 20 minutes with PFA 3% 16 hours post-infection.

Immunoblotting. Cells were rinsed 3 times with cold PBS, and lysed at 4°C for 20 min in a buffer containing 50 mM TrisCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton- X, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, and a mix of protease inhibitors (Complete). Insoluble material was removed by centrifugation. The protein content was determined by the bicinchoninic acid method as recommended by the manufacturer (Sigma), using bovine serum albumin as the standard. The proteins were then resolved by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-ECL; Amersham) using a Trans-Blot apparatus (Bio-Rad). Proteins of interest were revealed with specific primary antibodies, followed by species-specific secondary antibodies conjugated to peroxidase. Proteins were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL Plus, GE healthcare). The signals were recorded using a LAS 3000 apparatus (Fujifilm). Quantification of unsaturated signals was carried out using the gel quantification function of ImageJ.

Immunofluorescence. Indirect immunofluorescence labeling was performed as previously described (Rouillé *et al.*, 2006). Lipid droplets were stained with BODIPY 493/503 (0.5 μ g/ml; Invitrogen) for 10 min at room temperature. Nuclei were stained with DAPI. For colocalization experiments, confocal microscopy was carried out with an LSM780 confocal microscope (Zeiss) using a 63X oil immersion objective with a 1.4

numerical aperture. Signals were sequentially collected using single fluorescence excitation and acquisition settings to avoid crossover. Images were processed using Adobe Photoshop software CS4.

BFA rescue experiments. GBF1 mutants used in this study were as previously described (Belov *et al.*, 2010). Inactive E794K and BFA-resistant M832L mutants were used as previously described (Goueslain *et al.*, 2010). Cells were transfected with the GBF1 mutants and then infected with the JFH1-CSN6A4 in the presence or not of 50 ng/ml of BFA. Cells were lysed and the expression level of HCV E1 (A4) was measured by western blot. The expression level of each mutant with ethanol was set to 100%. The expression of HCV E1 for the BFA treated condition was calculated to the ethanol control. Same experiments were done to check the secretion percentage of HAS in the same conditions.

Viability assay. Subconfluent cell cultures grown in 96-well plates were incubated with BFA for 24 h. An MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]-based viability assay (CellTiter 96 aqueous nonradioactive cell proliferation assay from Promega) was conducted as recommended by the manufacturer.

Albumin secretion assay. Subconfluent cell cultures grown in 12-well plates were incubated for 24 h in 1 ml of complete culture medium. Culture media were collected and centrifuged to remove cells debris. Cells were rinsed with PBS, and lysed in lysis buffer for 20 min on ice. The HSA concentration in the supernatants and lysates was determined by ELISA, using human serum albumin (HSA) as a standard, as described (Snooks *et al.*, 2008). The percentage of secretion was calculated as the percentage of HSA in the medium divided by the total amount of HSA in the medium and the lysate.

HCVpp. Pseudotyped particles were produced as described previously (Bartosch *et al.*, 2003) Briefly, 293T cells were cotransfected with a murine leukemia virus (MLV)-based transfer vector encoding luciferase (Op De Beeck *et al.*, 2004), a murine leukemia virus Gag-Pol packaging construct, and an envelope glycoprotein-expressing vector, phCMV-E1E2, using Exgen 500. The phCMV-G, and phCMV-RD114 expression vectors, encoding the vesicular stomatitis virus G protein (VSV G), and the feline endogenous virus RD114 glycoprotein, respectively, were used to produce control pseudotyped particles harboring VSV G or RD114 envelope glycoproteins on murine leukemia virus cores

(VSVpp and RD114pp, respectively). The luciferase-based HCVpp infection assay was as previously described (Op De Beeck *et al.*, 2004).

RNA interference. RNA interference experiments were carried out with pools of four different synthetic double-stranded siRNAs to the same target (on-target plus smart pool reagents from Dharmacon). Due to an off-target effect with the pool against Arf1 we used a mix of 2 individual siRNAs (J-011580-05-0005 & J-011580-08-0005). The control used in this study was the on-target plus non-targeting siRNA #1 (D-001810-01-20).

For siRNA transfection, 6 μ l of lipofectamine RNAi MAX were added to 0,5 ml of D-PBS and incubated for 3 min. In a 6-well plate 2.5 μ l of siRNA at 20 μ M (50 pmol) were incubated with the transfection mix for 30 min at room temperature. Approximately 250.000 cells in a volume of 2 ml of complete DMEM medium were added. Cells were trypsinized 24 h later and seeded in 24-well clusters, and analyzed by immunofluorescence 4 days after siRNA transfection. For quantifying HCVcc infection, siRNA-treated cells were infected 48 h after trypsinization. Just before infection, extra wells of cells treated with each siRNA were used to extract RNA for quantifying the depletion efficiency. Cells were stained with anti-E1 mAb and DAPI and HCVcc-infected were counted.

Quantitative RT-PCR Total RNA was extracted from siRNA-transfected cells using Nucleospin RNA II extraction kit (Macherey-Nagel), which includes a DNase I treatment. cDNA was obtained from RNA using the High Capacity cDNA Reverse transcription kit (Life Technologies) in a final volume of 20 μ l. Quantitative RT-PCR analysis was performed using the Taqman® pre-designed gene expression assay approach (Applied Biosystems), using 1 μ l of cDNA and premade probes designed by the manufacturer. The ratio of the mRNA level of each gene to that of large ribosomal protein P0 (RPLP0) endogenous control mRNA was calculated by the $\Delta\Delta C_t$ method (Livak and Schmittgen, 2001), and a value of 100 was assigned to control siRNA-transfected cells. Each experiment was performed in triplicate and repeated three times.

RESULTS

Role of the Sec7 domain of GBF1 in HCV infection. It has recently been reported that GBF1 but not Arf activation is required for poliovirus replication (Belov *et al.*, 2010), suggesting that GBF1 may have other functions than Arf activation. More specifically, a catalytically inactive GBF1 truncation mutant lacking the Sec7 domain has been reported to be sufficient for rescuing poliovirus replication from BFA inhibition. To investigate if GBF1 could also function in a Sec7-independent manner in HCV replication, we expressed a series of GBF1 truncation mutants (figure 1A) in Huh-7 cells and infected them with HCVcc in the presence of BFA. We used a dose of 50 ng/ml BFA, which decreases HCV infection about 10 times and has minimal cytotoxic effects in Huh-7 cells during the time scale of the HCVcc infection assay (Goueslain *et al.*, 2010). GBF1 constructs expression and HCV infection were probed by immunoblotting (figure 1B). The BFA treatment had no impact on the expression of GBF1 constructs. In the absence of BFA, similar E1 expression levels were observed with all GBF1 constructs, indicating that none of these constructs had any dominant-negative effect on HCV infection. In the presence of BFA, E1 expression levels were reduced about 10-20 times in untransfected cells or in cells expressing YFP. HCV infection was partially rescued in cells expressing full-length wild-type or M832L BFA-resistant constructs, whereas the E794K inactive mutant was unable to rescue HCV infection in the presence of BFA, as previously reported (Goueslain *et al.*, 2010). The GBF1 Δ 37 construct lacking a rab1b-interaction site located in the 37 N-terminal residues (Monetta *et al.*, 2007) did not rescue HCV infection in the presence of BFA. Importantly, unlike for poliovirus, all the C-terminal deletion constructs including GBF1(1-710), which lacks a Sec7 domain, were unable to rescue HCV infection in these complementation experiments (figure 1B and C). These results do not support a Sec7-independent function of GBF1 in HCV infection.

As a control we also quantified the impact of GBF1 constructs on the secretion of human serum albumin (HSA) by BFA-treated Huh-7 cells. A well-established function of GBF1 is the control of membrane dynamics of the early secretory pathway, and this function relies on Arf1 activation. Therefore, HSA secretion is a marker of GBF1-mediated Arf activation in these experiments. The treatment of Huh-7 cells with 50 ng/ml BFA decreased albumin secretion in control mock-, or YFP-transfected cells (figure 1D). As expected, wild-type and M832L GBF1 constructs partially restored albumin secretion,

but none of the other constructs did. These results indicate a similar requirement of GBF1 domains for HCV infection and for Arf activation.

ArfGAP1 inhibitor QS11 inhibits HCV replication. In addition to guanine nucleotide exchange factors, such as GBF1, the function of Arf proteins is also regulated by GTPase-activating proteins, or ArfGAPs. More than 30 genes coding for proteins with an ArfGAP domain have been identified in the human genome (Kahn *et al.*, 2008; Donaldson and Jackson, 2011). We investigated the involvement of ArfGAP1 in HCV replication, because ArfGAP1 is localized in the cis-Golgi and functions together with GBF1 in the formation of COP-I vesicles. HCV infection was inhibited in a dose-dependent manner by QS11 (figure 2A), a specific inhibitor of ArfGAP1 (Zhang *et al.*, 2007), and this inhibition did not result from a toxic effect of the drug (figure 2B). We investigated which step is inhibited by QS11. Using a replication assay, we observed a dose-dependent inhibition of HCV replication (figure 2C). In contrast, an increase in HCVpp infection was observed in the presence of QS11 (figure 2D), indicating that this drug does not interfere with HCV entry. Taken together, these results are consistent with an involvement of ArfGAP1 in the replication step of the HCV life cycle, and are in line with a role of ArfGAP1 in HCV replication recently reported by Li *et al.* while these experiments were in progress (Li *et al.*, 2014).

Dominant negative mutants of Arf1 inhibit HCV infection. Our results with GBF1 truncation mutants and ArfGAP1 inhibitor strongly suggest that the activation of an Arf family member is important for HCV infection. We investigated this question using two different mutants of Arf1 affecting GDP exchange (T31N) or GTP hydrolysis (Q71L). When overexpressed, these two mutants act as dominant negative mutants in a protein transport assay and block the intracellular traffic at different steps of the early secretory pathway (Dascher and Balch, 1994). Arf mutants were expressed as EGFP or mCherry fusion proteins in Huh-7 cells and the cells were infected with HCVcc. The infection was monitored by immunofluorescence (figure 3A) and the percentage of infected cells was quantified. As expected, the expression of the T31N mutant, which has a BFA-like effect, strongly inhibited HCV infection (figure 3B). The Q71L mutant, which is locked in the active, GTP-bound form, also strongly inhibited HCV infection, and the wild type Arf1 construct had a moderate impact compared to EGFP and mCherry controls. On the other

hand, Arf1 constructs did not have any effect on adenovirus infection, indicating that the effects observed with HCVcc did not result from any cytotoxic effects of Arf1 mutants. These results confirmed the involvement of Arf1 (or of another Arf family member) in HCV infection.

Role of Arf family members in HCV infection. The results with dominant negative mutants of Arf1 suggest that Arf1 and/or other Arf family members are involved in HCV infection. We used siRNA technology to determine which Arf proteins are specifically involved in HCV infection. Given the BFA sensitivity of HCV infection, we focused our study on class-I and class-II Arfs. Arf1, Arf3, Arf4 and Arf5 (human cells have no Arf2) were targeted with pools of 4 siRNAs, except for Arf1, which was targeted by 2 siRNAs only, because we found that the Arf1 pool contains 2 individual siRNAs also targeting Arf3 (Supplementary figure 1). Surprisingly, the depletion of each Arf protein resulted in a moderate (30-35%) inhibition of HCV infection (figure 4A). To assess the extent of siRNA-mediated Arf depletion, we quantified mRNAs, because specific antibodies are not commercially available for each Arf protein. The depletions were specific and reached 87% inhibition for Arf1 and about 95% inhibition for the other Arfs (figure 4B). We also observed an up-regulation of Arf4 expression upon Arf1 and to a lesser extent Arf3 depletion, suggesting the existence of compensatory mechanisms regulating the expression of Arf family members.

For this reason, we also depleted pairs of Arfs. Moreover Arfs may have overlapping functions, and it has been reported that the depletion of different pairs of Arfs results in specific phenotypes (Volpicelli-Daley *et al.*, 2005). Again, higher levels of Arf4 mRNA were observed upon Arf1+Arf3 depletion or Arf1+Arf5 depletion, confirming the up-regulation of Arf4 in Arf1-depleted cells (figure 4B). Interestingly, HCV infection was decreased down to 17±8% in cells depleted of Arf4 and Arf5, whereas the depletion of other pairs did not significantly decrease more HCV infection than single Arf depletions (figure 4A). These results indicate a special importance of class-II Arfs in HCV infection. We used HCVpp to assess the impact of the depletion of class-II Arfs on HCV entry. As controls we used VSVpp and RD114pp, which enter by endocytosis and pH-dependent fusion or by pH-independent fusion at the plasma membrane, respectively. The infection by all three types of pseudoparticles was strongly inhibited in cells depleted of Arf4 and Arf5, as indicated by a decrease of about 90-95% of luciferase activity (figure 4C). This

unspecific inhibition suggests the existence of a post-fusion blockade of pseudoparticle entry in cells depleted of Arf4 and Arf5, which did not allow us to conclude about the role of class II Arfs in HCV entry with this tool.

To determine if the replication step of the HCV life cycle is affected by the depletion of class-II Arfs, siRNA-transfected Huh-7 cells were electroporated with an in vitro-transcribed recombinant Δ E1E2 JFH1 genomic RNA expressing a *Renilla* luciferase reporter. Replication was assessed by measuring luciferase activity 48 hours after electroporation. Luciferase activity was reduced about 4 times in cells depleted of Arf4 and Arf5 (figure 4D), indicating an inhibition of HCV replication.

Impact of class-II Arfs depletion on the secretory pathway. To get insight into a mechanism of action of class-II Arfs, we analyzed their intracellular localization in Huh-7 cells using immunofluorescence confocal microscopy. Given the lack of specific antibodies, cells were transfected with expression vectors for Arf4-GFP or Arf5-GFP. Both Arf4-GFP and Arf5-GFP were observed in Golgi-like perinuclear structures together with a diffuse staining of the cytosol and the nucleus (figure 5), which is consistent with the dual localization of Arf proteins as membrane associated and soluble proteins. Arf4- and Arf5-positive perinuclear structures were also labeled with an antibody to GM130 (figure 5A), indicating that they are localized in the cis-Golgi. Interestingly, Arf4 and Arf5 perinuclear structures also colocalized with GBF1 (figure 5B).

To examine the impact of their depletion on the secretory pathway, we first investigated the morphology of cellular compartments. We observed a more compact Golgi morphology in cells depleted of Arf4 and Arf5 than in control cells using the cis-Golgi marker GM130 (figure 6A). In contrast, the depletion of Arf1 and Arf4 resulted in a fragmentation of the cis-Golgi marker, as previously reported for HeLa cells (Volpicelli-Daley *et al.*, 2005). This result indicates that the pair of class II Arfs does not contribute to the Golgi scattering effect of GBF1 inhibition. A similar compact phenotype was also observed with TGN46, a marker of the trans-Golgi network (data not shown), indicating that the effect is not restricted to the cis-Golgi. To confirm the absence of effect of Arf4 and Arf5 depletion on the secretory pathway, we measured the secretion of albumin and apolipoprotein E (apoE), two proteins expressed and secreted by Huh-7 cells. Albumin secretion was not affected by the depletion of Arf4 and Arf 5 (figure 6B). In contrast the depletion of Arf 1 and Arf 4 resulted in a reduction of its secretion. Similarly, when apoE was monitored by immunoblotting, no difference with control cells was observed in cells

depleted of Arf4 and Arf5, whereas an excess of apoE retained in the lysate of cells depleted of Arf 1 and Arf 4 was observed, indicating a reduction of apoE secretion (figure 6C). These results indicate that the depletion of class II Arfs has no morphological or functional impact on the secretory pathway.

Impact of class II Arfs depletion on the lipid droplets. In addition to its role as a regulator of the early secretory pathway, GBF1 is also known to regulate lipid droplets (Guo *et al.*, 2008; Beller *et al.*, 2008; Soni *et al.*, 2009). Given the lack of effect of class II Arfs on the secretory pathway, we also investigated the morphology of lipid droplets after Arf depletion. Lipid droplets were stained with Bodipy493/503 and the Golgi was also labeled with an antibody to GM130 to verify the effect of Arf4 and Arf5 depletion. In cells depleted of Arf4 and Arf5, lipid droplets were packed together at the periphery, often in one extension of the cell, unlike in control cells where lipid droplets were usually scattered throughout the cytoplasm (figure 7A). A similar effect was observed in cells treated with a low dose of BFA for 24 hours (figure 7B), or in cells depleted of GBF1 (not shown), suggesting that the action of class II Arfs on lipid droplets is regulated by GBF1. This result suggests that class II Arfs participate in the regulation of lipid metabolism.

DISCUSSION

In this study we investigated the mechanism of action of GBF1 in HCV infection. Our results suggest that GBF1 functions by activating class II Arfs. This is different from what has been reported for its function in poliovirus infection, for which its GEF activity is not required (Belov *et al.*, 2010). A series of GBF1 truncation mutants inactive for regulating the secretory pathway of the cell, including a construct lacking a Sec7 domain, were shown to complement BFA inhibition in a poliovirus replication assay. Here we showed that unlike poliovirus, this series of GBF1 mutants do not support HCV replication, clearly indicating a difference of action for GBF1 in poliovirus and HCV replication. This requirement for GEF activity was confirmed with the use of Arf1 dominant negative mutants and of an ArfGAP1 inhibitor. However, the function of GBF1 in HCV replication is also different from its function in membrane traffic, as already suggested by our previous study of BFA resistant cell lines (Farhat *et al.*, 2013). Indeed our results suggest that GBF1 may act by activating different pairs of Arf proteins. GBF1 control of the secretory pathway is mediated by the pair Arf1-Arf4, whereas the pair Arf4-Arf5 mediates its function in HCV replication. Interestingly, Arf4 and Arf5 have also been reported to be involved in dengue virus infection, although for this virus, the function of this pair of Arfs was suggested to be involved in the assembly step (Kudelko *et al.*, 2012).

Based on siRNA experiments, previous studies, including our own, suggested an involvement of Arf1 in HCV replication (Matto *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Farhat *et al.*, 2013) that we did not observed in this study. However in none of these previous studies were the results of siRNA depletions confirmed by re-expressing Arf1, in order to rule out off-target effects and by comparing the different BFA-sensitive Arf family members. Off-target effects are always a potential pitfall with siRNA experiments, as exemplified by our finding that the commercial siRNA pool targeting Arf1 also inhibits Arf3 expression. Reducing siRNA concentration may help to reduce off-target effects. Using a more efficient transfection agent allowed us to decrease the siRNA concentration from 80 nM previously used down to 20 nM in this study, with better depletion results on control proteins (data not shown). With these new experimental conditions, Arf1 depletion resulted in a less important inhibition of HCV replication (from about 50% in our previous study (Farhat *et al.*, 2013) down to about 30% inhibition in this study) despite an efficient reduction of Arf1 expression. Obviously, it remains for us to perform complementation experiments to completely confirm the

involvement of Arf4 and Arf5 in HCV infection. However, we feel that the need of a double depletion reduces chances of off-target effects.

Specific phenotypes were already reported for different pairs of Arfs (Volpicelli-Daley *et al.*, 2005). In our study, the depletion of Arf4 and Arf5 displayed a BFA-like effect on lipid droplets morphology and on HCV infection that the pair Arf1-Arf4 did not. On the other hand, the depletion of the Arf1-Arf4 pair resulted in a BFA-like inhibition of HSA and ApoE secretion, whereas the depletion of the Arf4-Arf5 pair did not. Cells depleted of Arf1 and Arf4 also displayed a scattered Golgi very similar to what is observed in BFA-treated cells or in cells depleted of GBF1, whereas cells depleted of Arf4 and Arf5 had a more compact Golgi morphology than control cells. This effect is not mimicked by GBF1 inhibition, but is rather reminiscent of cells treated with latrunculin B, an inhibitor of actin polymerization (Valderrama *et al.*, 2001; Dippold *et al.*, 2009). Therefore, the Arf4-Arf5 pair could potentially activate an effector involved in the regulation of the actin cytoskeleton. Alternatively, we can also speculate that this effect could result from an alteration of the metabolism of phosphoinositides, because actin fibers are linked to Golgi membranes by PI4P-interacting protein GOLPH3 (Dippold *et al.*, 2009). Taken together these results suggest that GBF1 fulfills its different cellular functions by activating different pairs of Arfs, which control different aspects of the metabolism.

An intriguing question is how each pair of Arf controls a specific pathway. This appears to be a common feature of G-proteins of the Arf family (Panic *et al.*, 2003; Setty *et al.*, 2003; Volpicelli-Daley *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2007). A simple redundancy of action is unlikely. Indeed if one Arf could just replace another one in a given pathway, why would it not be able to do so in another pathway? Another model for Arf pair specificity could be the formation of Arf dimers, at the site of interaction with effectors. However, such a kind of interactions has not yet been reported to our knowledge. It is also possible that the recruitment or the activation of one Arf would depend on the activation of the other one. This cascade of action would be more compatible with an inhibition of their action in cells depleted of either one of them. However, if the selectivity of the system were not strict, then it would be compatible with an inhibition the system only visible in double depleted cells. It would be interesting to determine if such a mode of action occurs for Arf1-Arf4 and Arf4-Arf5 pairs, as it seems to occur at the cell periphery with an Arf6-Arf1 pair (Cohen *et al.*, 2007).

In conclusion, our results indicate that the role of GBF1 in HCV replication is mediated by its ArfGEF activity and is primarily related to its function of regulator of lipid metabolism, rather than of regulator of the protein secretory pathway. Interestingly, two members of the Arf family, the class II Arf4 and Arf5, appear to be of special importance for mediating GBF1 function in HCV replication. Although very few things are known about the specific functions of these two Arfs, data from our study and from another group (Takashima *et al.*, 2011) suggest their involvement in the control of lipid metabolism, as evidenced by the abnormal morphology of lipid droplets in cells depleted of Arf4 and Arf5. Further studies will be needed to determine the nature of the enzymes or transporters involved in lipid metabolism that are effectors of Arf4 and Arf5. These proteins may constitute host factors essential for the replication of HCV and potentially other RNA viruses.

REFERENCES

- Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F.-L. (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* **197**: 633–642.
- Beller, M., Sztalryd, C., Southall, N., Bell, M., Jäckle, H., Auld, D.S., and Oliver, B. (2008) COPI complex is a regulator of lipid homeostasis. *PLoS Biol* **6**: e292.
- Belov, G.A., Feng, Q., Nikovics, K., Jackson, C.L., and Ehrenfeld, E. (2008) A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog* **4**: e1000216.
- Belov, G.A., Kovtunovych, G., Jackson, C.L., and Ehrenfeld, E. (2010) Poliovirus replication requires the N-terminus but not the catalytic Sec7 domain of ArfGEF GBF1. *Cell Microbiol* **12**: 1463–1479.
- Belov, G.A., Nair, V., Hansen, B.T., Hoyt, F.H., Fischer, E.R., and Ehrenfeld, E. (2012) Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J Virol* **86**: 302–312.
- Berger, K.L., Cooper, J.D., Heaton, N.S., Yoon, R., Oakland, T.E., Jordan, T.X., *et al.* (2009) Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 7577–7582.
- Borawski, J., Troke, P., Puyang, X., Gibaja, V., Zhao, S., Mickanin, C., *et al.* (2009) Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *J Virol* **83**: 10058–10074.
- Bui, Q.T., Golinelli-Cohen, M.-P., and Jackson, C.L. (2009) Large Arf1 guanine nucleotide exchange factors: evolution, domain structure, and roles in membrane trafficking and human disease. *Mol Genet Genomics* **282**: 329–350.
- Carpp, L.N., Rogers, R.S., Moritz, R.L., and Aitchison, J.D. (2014) Quantitative proteomic analysis of host-virus interactions reveals a role for GBF1 in dengue infection. *Mol Cell Proteomics*.
- Cherry, S., Kunte, A., Wang, H., Coyne, C., Rawson, R.B., and Perrimon, N. (2006) COPI activity coupled with fatty acid biosynthesis is required for viral replication. *PLoS Pathog* **2**: e102.
- Claude, A., Zhao, B.P., Kuziemy, C.E., Dahan, S., Berger, S.J., Yan, J.P., *et al.* (1999) GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J Cell Biol* **146**: 71–84.
- Cohen, L.A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F.D., Balla, T., and Donaldson, J.G. (2007) Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell* **18**: 2244–2253.
- Dascher, C., and Balch, W.E. (1994) Dominant inhibitory mutants of ARF1 block

endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* **269**: 1437–1448.

Delgrange, D., Pillez, A., Castelain, S., Cocquerel, L., Rouillé, Y., Dubuisson, J., *et al.* (2007) Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol* **88**: 2495–2503.

Dippold, H.C., Ng, M.M., Farber-Katz, S.E., Lee, S.-K., Kerr, M.L., Peterman, M.C., *et al.* (2009) GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4- phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding. *Cell* **139**: 337–351.

Donaldson, J.G., and Jackson, C.L. (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 362–375.

Dubuisson, J., Hsu, H.H., Cheung, R.C., Greenberg, H.B., Russell, D.G., and Rice, C.M. (1994) Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* **68**: 6147–6160.

Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**: 5974–5984.

Farhat, R., Goueslain, L., Wychowski, C., Belouzard, S., Fénéant, L., Jackson, C.L., *et al.* (2013) Hepatitis C virus replication and Golgi function in brefeldin A-resistant hepatoma-derived cells. *PLoS ONE* **8**: e74491.

Ferraris, P., Blanchard, E., and Roingeard, P. (2010) Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *Journal of General Virology* **91**: 2230–2237.

Gazina, E.V., Mackenzie, J.M., Gorrell, R.J., and Anderson, D.A. (2002) Differential requirements for COPI coats in formation of replication complexes among three genera of Picornaviridae. *J Virol* **76**: 11113–11122.

Gillespie, L.K., Hoenen, A., Morgan, G., and Mackenzie, J.M. (2010) The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. **84**: 10438–10447.

Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingeard, P., Descamps, V., Duverlie, G., *et al.* (2010) Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **84**: 773–787.

Guo, Y., Walther, T.C., Rao, M., Stuurman, N., Goshima, G., Terayama, K., *et al.* (2008) Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature* **453**: 657–661.

Kahn, R.A., Bruford, E., Inoue, H., Logsdon, J.M., Nie, Z., Premont, R.T., *et al.* (2008) Consensus nomenclature for the human ArfGAP domain-containing proteins. *J Cell Biol* **182**: 1039–1044.

- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., and Wakita, T. (2003) Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* **125**: 1808–1817.
- Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S.H.E.V.D., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Koster, A.J., *et al.* (2008) SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* **6**: e226.
- Kudelko, M., Brault, J.-B., Kwok, K., Li, M.Y., Pardigon, N., Peiris, J.S.M., *et al.* (2012) Class II ADP-ribosylation factors are required for efficient secretion of dengue viruses. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 767–777.
- Lanke, K.H.W., van der Schaar, H.M., Belov, G.A., Feng, Q., Duijsings, D., Jackson, C.L., *et al.* (2009) GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for coxsackievirus B3 RNA replication. *J Virol* **83**: 11940–11949.
- Li, H., Yang, X., Yang, G., Hong, Z., Zhou, L., Yin, P., *et al.* (2014) Hepatitis C virus NS5A hijacks ARFGAP1 to maintain a PI4P-enriched microenvironment. *J Virol*.
- Limpens, R.W.A.L., van der Schaar, H.M., Kumar, D., Koster, A.J., Snijder, E.J., van Kuppeveld, F.J.M., and Bárcena, M. (2011) The transformation of enterovirus replication structures: a three-dimensional study of single- and double-membrane compartments. *MBio* **2**.
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wölk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., *et al.* (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**: 623–626.
- Lindenbach, B.D., Thiel, H.-J., and Rice, C.M. (2007) Flaviviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology* 1101–1152.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Matto, M., Sklan, E.H., David, N., Melamed-Book, N., Casanova, J.E., Glenn, J.S., and Aroeti, B. (2011) Role for ADP Ribosylation Factor 1 in the Regulation of Hepatitis C Virus Replication. *J Virol* **85**: 946–956.
- Monetta, P., Slavin, I., Romero, N., and Alvarez, C. (2007) Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Mol Biol Cell* **18**: 2400–2410.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J. (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **42**: 3858–3863.
- Op De Beeck, A., Voisset, C., Bartosch, B., Ciczora, Y., Cocquerel, L., Keck, Z., *et al.* (2004) Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* **78**: 2994–3002.
- Panic, B., Whyte, J.R.C., and Munro, S. (2003) The ARF-like GTPases Arl1p and Arl3p act in a pathway that interacts with vesicle-tethering factors at the Golgi apparatus. *Curr Biol* **13**: 405–410.

- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.Y., Chlanda, P., Haselman, U., *et al.* (2012) Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* **8**: e1003056.
- Rouillé, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., *et al.* (2006) Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol* **80**: 2832–2841.
- Setty, S.R.G., Shin, M.E., Yoshino, A., Marks, M.S., and Burd, C.G. (2003) Golgi recruitment of GRIP domain proteins by Arf-like GTPase 1 is regulated by Arf-like GTPase 3. *Curr Biol* **13**: 401–404.
- Snooks, M.J., Bhat, P., Mackenzie, J., Counihan, N.A., Vaughan, N., and Anderson, D.A. (2008) Vectorial entry and release of hepatitis A virus in polarized human hepatocytes. *J Virol* **82**: 8733–8742.
- Soni, K.G., Mardones, G.A., Sougrat, R., Smirnova, E., Jackson, C.L., and Bonifacino, J.S. (2009) Coatamer-dependent protein delivery to lipid droplets. *J Cell Sci* **122**: 1834–1841.
- Szul, T., Grabski, R., Lyons, S., Morohashi, Y., Shestopal, S., Lowe, M., and Sztul, E. (2007) Dissecting the role of the ARF guanine nucleotide exchange factor GBF1 in Golgi biogenesis and protein trafficking. *J Cell Sci* **120**: 3929–3940.
- Tai, A.W., Benita, Y., Peng, L.F., Kim, S.-S., Sakamoto, N., Xavier, R.J., and Chung, R.T. (2009) A Functional Genomic Screen Identifies Cellular Cofactors of Hepatitis C Virus Replication. *Cell Host Microbe* **5**: 298–307.
- Takashima, K., Saitoh, A., Hirose, S., Nakai, W., Kondo, Y., Takasu, Y., *et al.* (2011) GBF1-Arf-COPI-ArfGAP-mediated Golgi-to-ER transport involved in regulation of lipid homeostasis. *Cell Struct Funct* **36**: 223–235.
- Trotard, M., Lepère-Douard, C., Régeard, M., Piquet-Pellorce, C., Lavillette, D., Cosset, F.-L., *et al.* (2009) Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening. *The FASEB Journal* **23**: 3780–3789.
- Ulasli, M., Verheije, M.H., de Haan, C.A.M., and Reggiori, F. (2010) Qualitative and quantitative ultrastructural analysis of the membrane rearrangements induced by coronavirus. *Cell Microbiol* **12**: 844–861.
- Vaillancourt, F.H., Pilote, L., Cartier, M., Lippens, J., Liuzzi, M., Bethell, R.C., *et al.* (2009) Identification of a lipid kinase as a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* **387**: 5–10.
- Valderrama, F., Durán, J.M., Babià, T., Barth, H., Renau-Piqueras, J., and Egea, G. (2001) Actin microfilaments facilitate the retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *Traffic* **2**: 717–726.
- Verheije, M.H., Raaben, M., Mari, M., Lintelo, te, E.G., Reggiori, F., van Kuppeveld, F.J.M., *et al.* (2008) Mouse hepatitis coronavirus RNA replication depends on GBF1-mediated ARF1 activation. *PLoS Pathog* **4**: e1000088.

Volpicelli-Daley, L.A., Li, Y., Zhang, C.-J., and Kahn, R.A. (2005) Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic. *Mol Biol Cell* **16**: 4495–4508.

Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., *et al.* (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**: 791–796.

Wang, J., Du, J., and Jin, Q. (2014) Class I ADP-Ribosylation Factors Are Involved in Enterovirus 71 Replication. *PLoS ONE* **9**: e99768.

Wang, J., Wu, Z., and Jin, Q. (2012) COPI is required for enterovirus 71 replication. *PLoS ONE* **7**: e38035.

Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K.E., Walther, P., *et al.* (2009) Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* **5**: 365–375.

Wright, J., Kahn, R.A., and Sztul, E. (2014) Regulating the large Sec7 ARF guanine nucleotide exchange factors: the when, where and how of activation. *Cell Mol Life Sci* **71**: 3419–3438.

Zhang, L., Hong, Z., Lin, W., Shao, R.-X., Goto, K., Hsu, V.W., and Chung, R.T. (2012) ARF1 and GBF1 Generate a PI4P-Enriched Environment Supportive of Hepatitis C Virus Replication. *PLoS ONE* **7**: e32135.

Zhang, Q., Major, M.B., Takanashi, S., Camp, N.D., Nishiya, N., Peters, E.C., *et al.* (2007) Small-molecule synergist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 7444–7448.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Activity of GBF1 truncation mutants in HCV replication. (A) Schematic representation of the constructs. (B) Huh-7 cells were transfected with the indicated constructs, infected 16 h later in the presence or the absence of BFA (50 ng/ml) and lysed 30 hpi. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with antibodies to E1 (top), GFP (middle) or tubulin (bottom). (C) Quantification of E1 signals. For each construct, the expression of E1 in the presence of BFA is expressed as a percentage of its expression in the absence of BFA. Values are means \pm SD of 3 independent experiments. (D) Transfected Huh-7 cells were incubated for 24 h with 50 ng/ml BFA and the amounts of HSA in cell lysates and culture media were quantified by ELISA. Values are expressed as percentage of secretion.

Figure 2. Inhibition of HCV replication by QS11. (A) Huh-7 cells were infected with HCV or GFP-expressing adenovirus in the presence of 0.2% ethanol or increasing concentrations of QS11. At 30 h postinfection, cells were fixed and processed for immunofluorescent detection of E1, and infected cells were counted. Infection of ethanol-treated sample is expressed as 100%. (B) Huh-7 cells were incubated for 24 h in the presence of 0.2% EtOH or increasing concentrations of QS11. Viability was assessed using an MTS assay. The absorbance of the ethanol-treated sample is expressed as 100%. (C) Huh-7 cells were electroporated with a recombinant HCV genome containing a deletion in E1E2 and expressing *Renilla* luciferase and were cultured in the presence of QS11 for 48 h. For comparison, Huh-7 cells were electroporated with a nonreplicative (GND) HCV genome and cultured in the absence of QS11. Samples were harvested for luciferase assay at 48 h post electroporation. The luciferase activity from ethanol-treated cells at 4 h post electroporation is expressed as 1. (D) Huh-7 cells were infected with HCVpp or RD114pp in the presence of 0.2% ethanol or increasing concentrations of QS11. Luciferase activity was measured at 24 hpi. The luciferase activity from ethanol-treated cells is expressed as 100%.

Figure 3. Effect of T31N and Q71L of Arf1 mutants on HCV infection. (A) Huh-7 cells were transfected with plasmids expressing either Arf1-GFP (WT), Arf1 T31N-GFP or Arf1 Q71L-GFP, and infected with HCVcc 16 hours after transfection. The cells were

fixed 30 hpi and infected cells were labeled with an anti-E1 antibody (red). Cells expressing Arf1 constructions were detected by GFP fluorescence (green). Each field is presented in duplicate, with an image corresponding to the infection at the top and the image corresponding to merged signals at the bottom, to facilitate the visualization of the red staining. Arrows indicate cells expressing fluorescent fusion proteins (B) Huh-7 cells expressing GFP or mCherry (FP), Arf1 or Arf1 mutants fused to GFP or mCherry were infected with a VHCcc and the infection was quantified (blue series). A similar analysis was performed with an adenovirus expressing GFP in cells expressing the mCherry constructions (red series). The results are averages of 3 independent experiments (\pm SD).

Figure 4. Impact of Arf proteins depletion on HCV replication. (A) Huh-7 cells were transfected with indicated siRNA, infected with HCVcc or adenovirus 72 h post electroporation and processed for detection of infected cells by immunofluorescence. Infection of non-targeting siRNA-treated samples is expressed as 100%. (B) Total RNA was extracted from siRNA-transfected cells 72 h post transfection, and the indicated mRNAs were quantified by RT-qPCR. (C) siRNA-transfected cells were infected with HCVpp, RD114pp, or VSVpp. Luciferase activity was measured 48 hpi. For each pseudoparticle, the luciferase activity of non-targeting siRNA-transfected cells was set as 100%. (D) siRNA-transfected Huh-7 cells were electroporated with a Δ E1E2 HCV-RLuc genome, or a non-replicative control (GND). Samples were harvested for luciferase assay at 4h and 48 h post electroporation. HCV replication is expressed as of ratio of luciferase activity in 48 h over 4h samples.

Figure 5. Immunofluorescence analysis of Arf4 and Arf5 intracellular localization. Huh-7 cells transfected with Arf4-GFP or Arf5-GFP expression plasmids were fixed and processed for immunofluorescent detection of GM130 (A) or GBF1 (B). Representative confocal images of transfected cells are shown together with the merge image. Bars, 20 μ m.

Figure 6. Impact of Arf4 and Arf5 depletion on the secretory pathway. (A) Huh-7 cells were transfected with the indicated siRNA and fixed 72 h later. The morphology of the cis-Golgi was visualized by immunofluorescent staining of GM130 (red) and the

nuclei were stained with DAPI (blue). Bar, 20 μ m (B) siRNA-transfected cells were seeded in 12-well plates, and cultured in the presence of BFA for 24 h. The amounts of human serum albumin (HSA) in the conditioned culture media and in cell lysates were quantified with an ELISA assay and expressed as percentages of HSA secretion. (C) siRNA-transfected cells were cultured in 24-well plates. The amounts of apoE in cell lysates and culture media and of tubulin in cell lysates were analyzed by immunoblotting.

Figure 7. Impact of Arf4 and Arf5 depletion on the lipid droplets. (A) Huh-7 were transfected with indicated siRNAs and fixed 72 h later. Cells were fixed and processed for immunofluorescent detection of GM130 (red). Lipid droplets were stained with Bodipy 493/503 (green) and nuclei with DAPI (blue). (B) Huh-7 cells were cultured for 24 h in the presence or the absence of BFA (50 ng/ml), and processed for the detection of lipid droplets and nuclei. Representative confocal images are shown. Bars, 20 μ m.

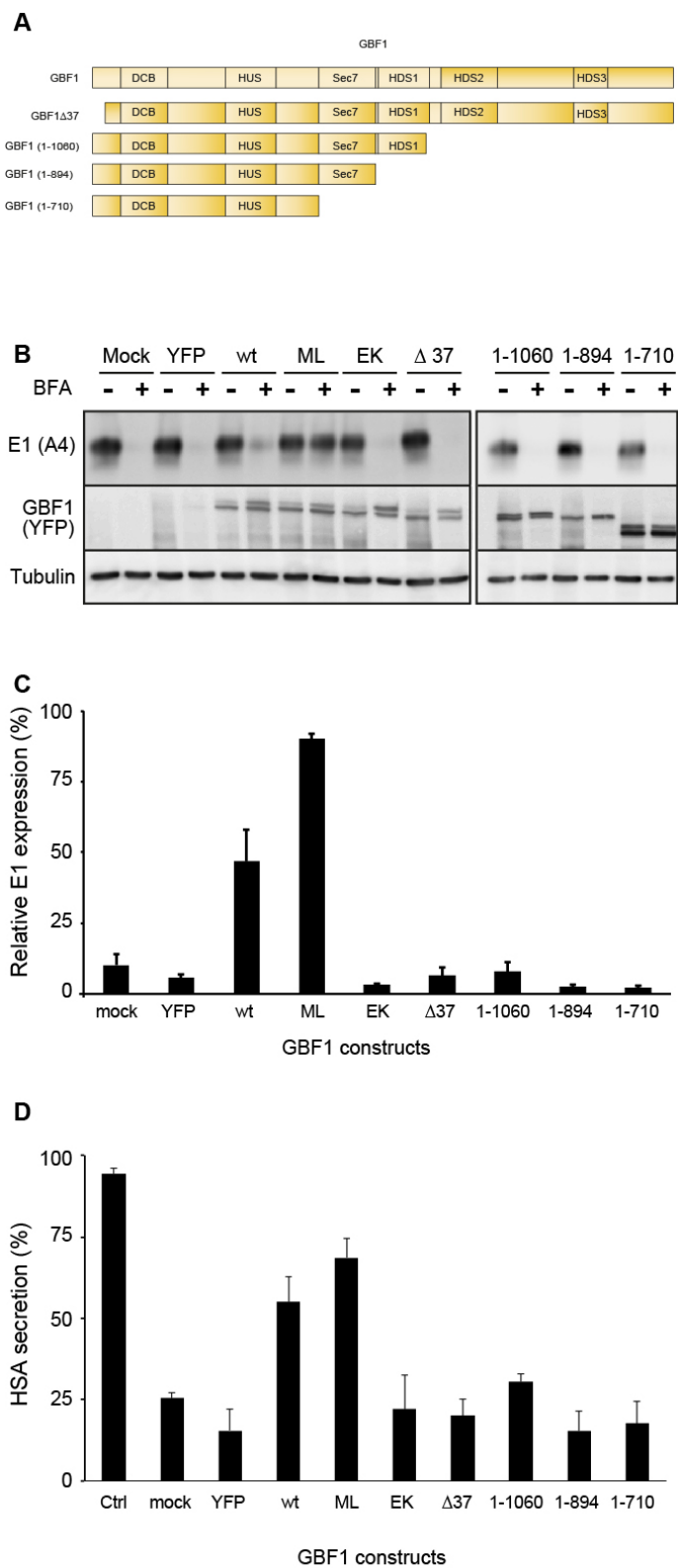


Fig 1

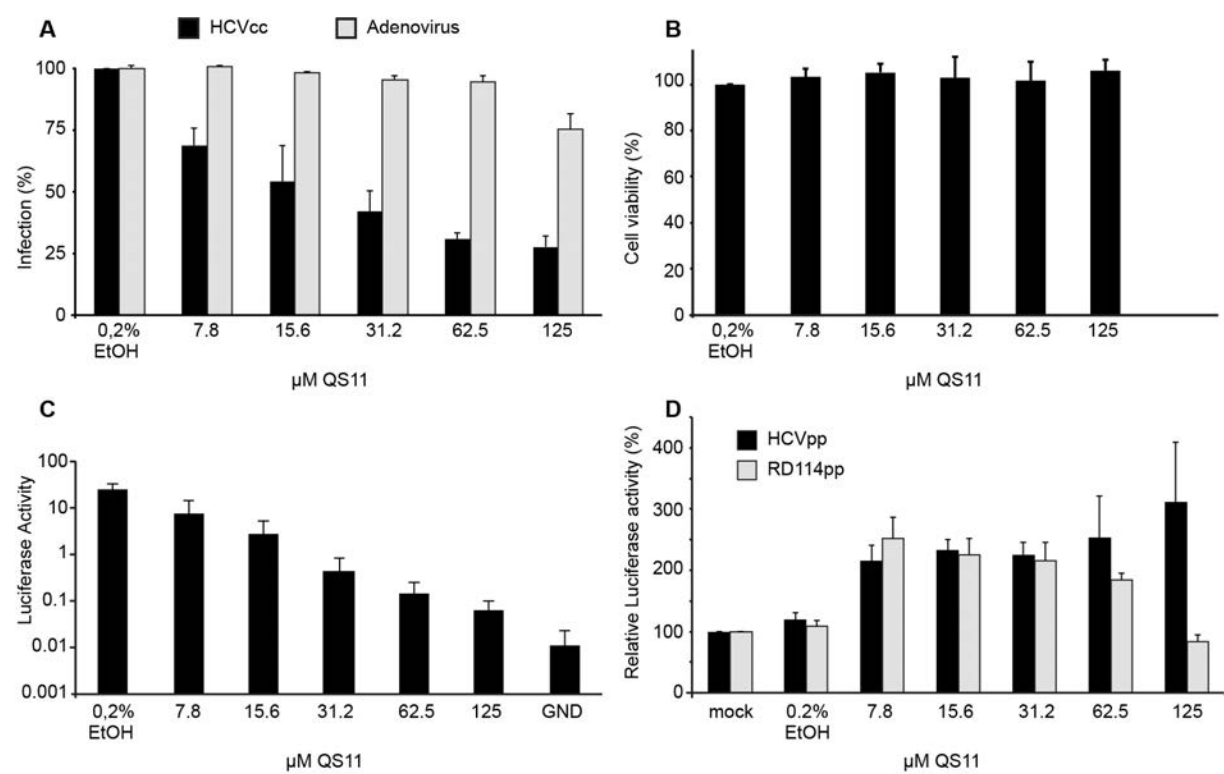


Fig 2

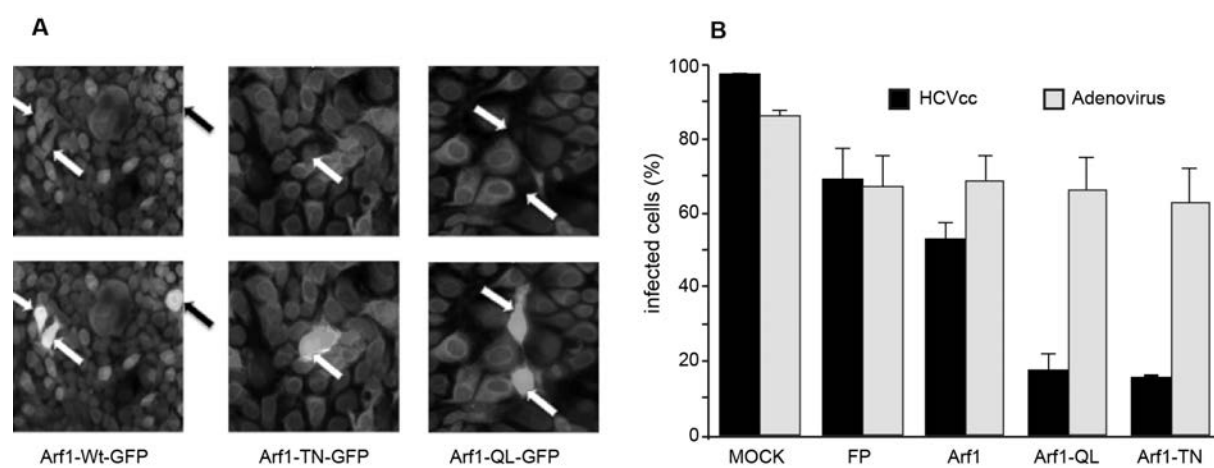
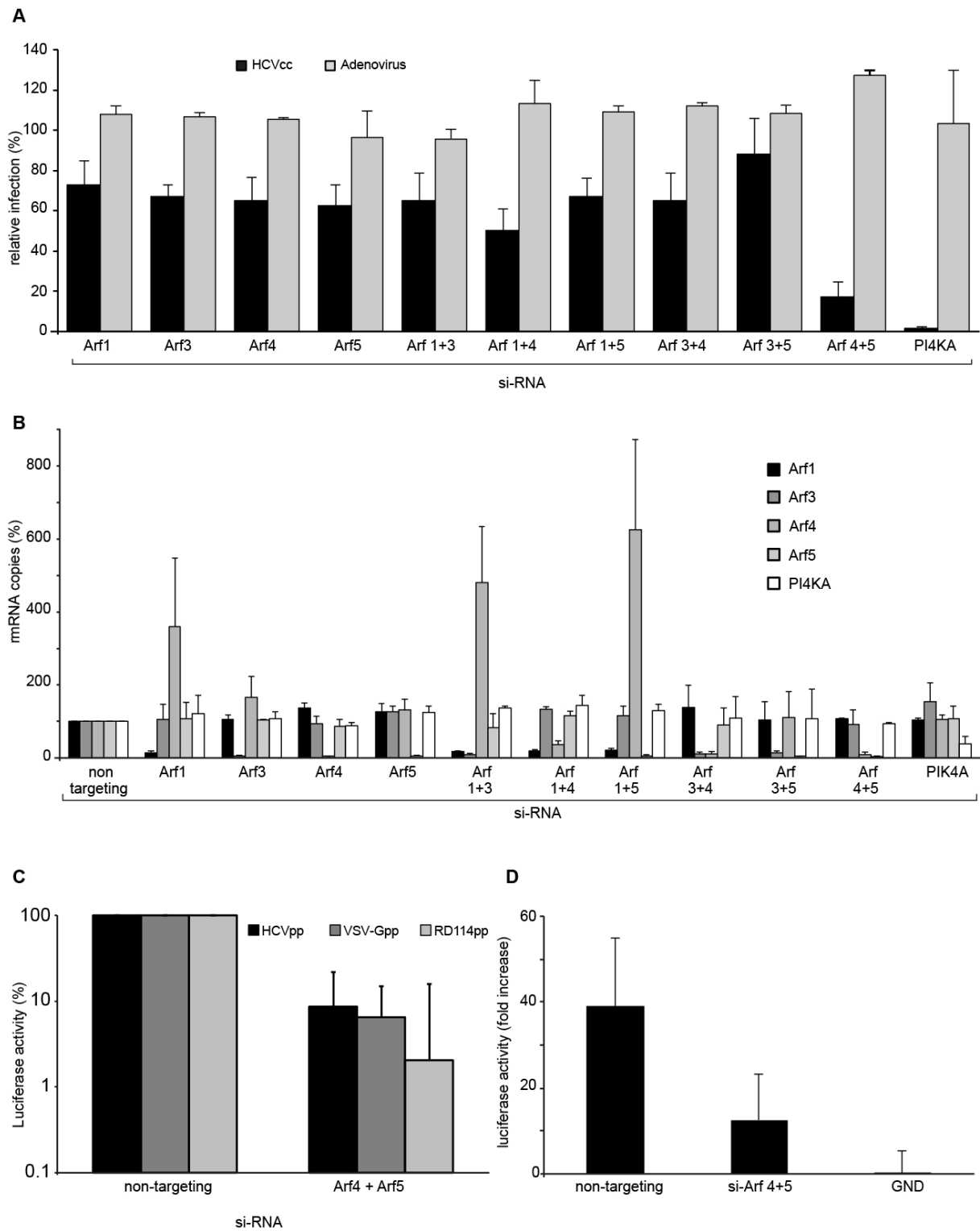


Fig 3



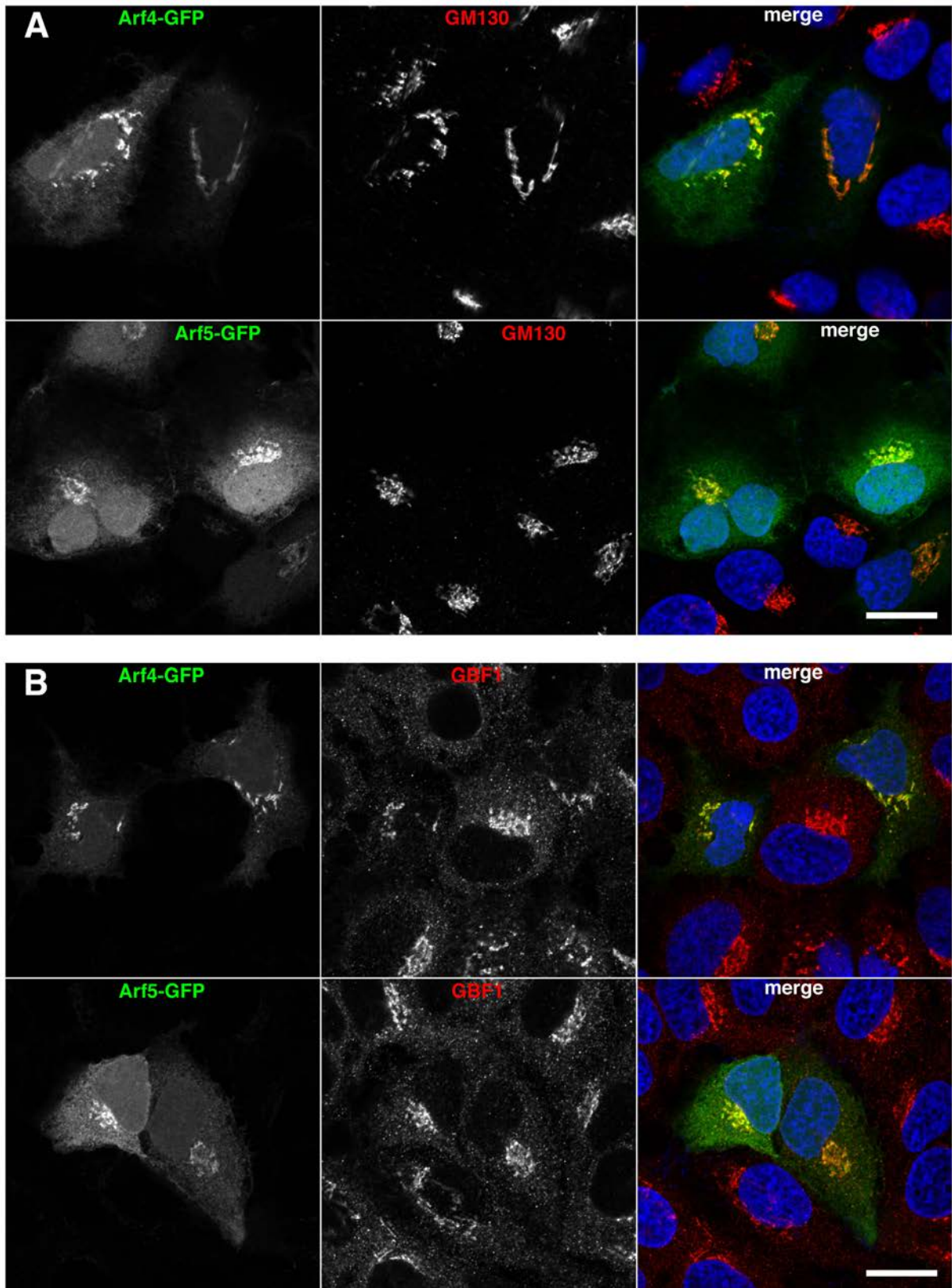


fig 5

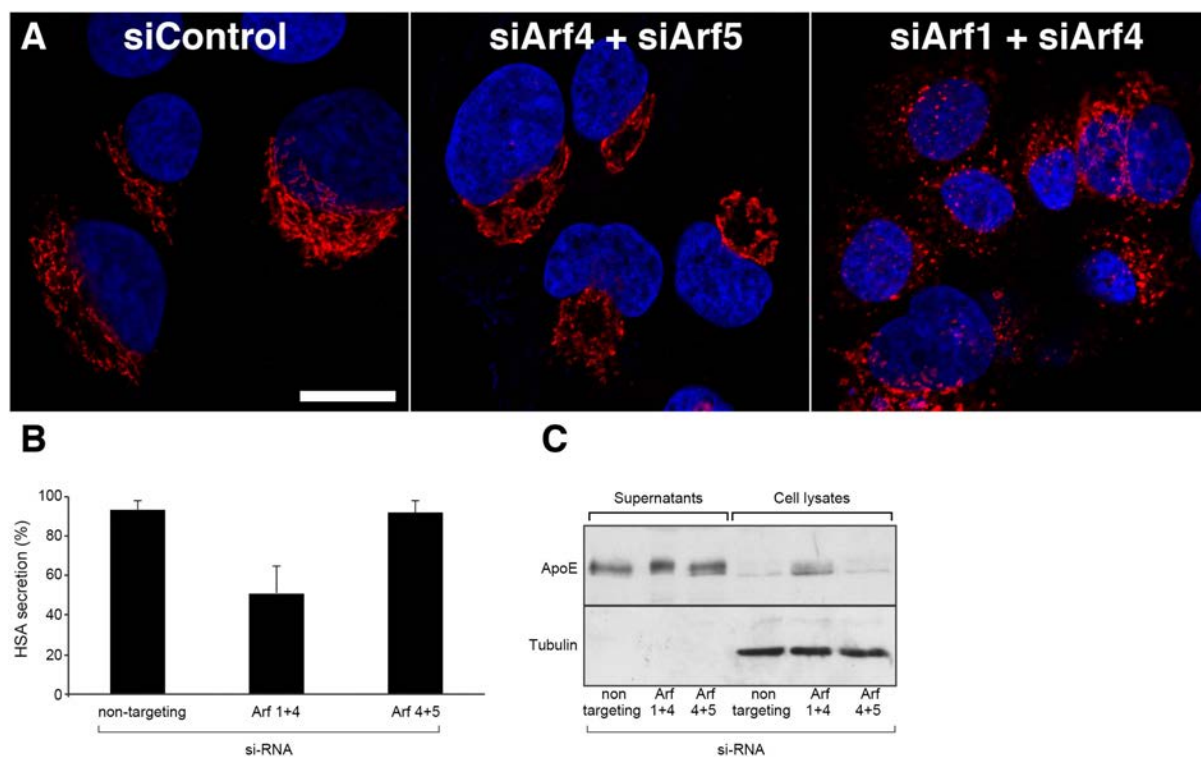


fig6

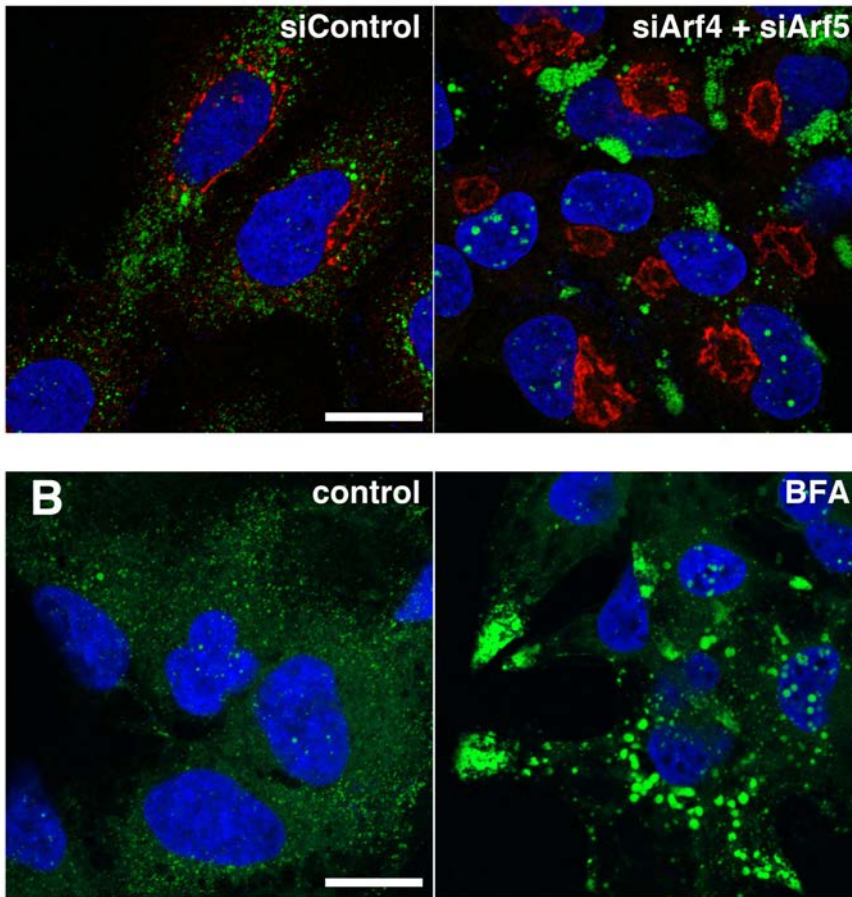


fig 7

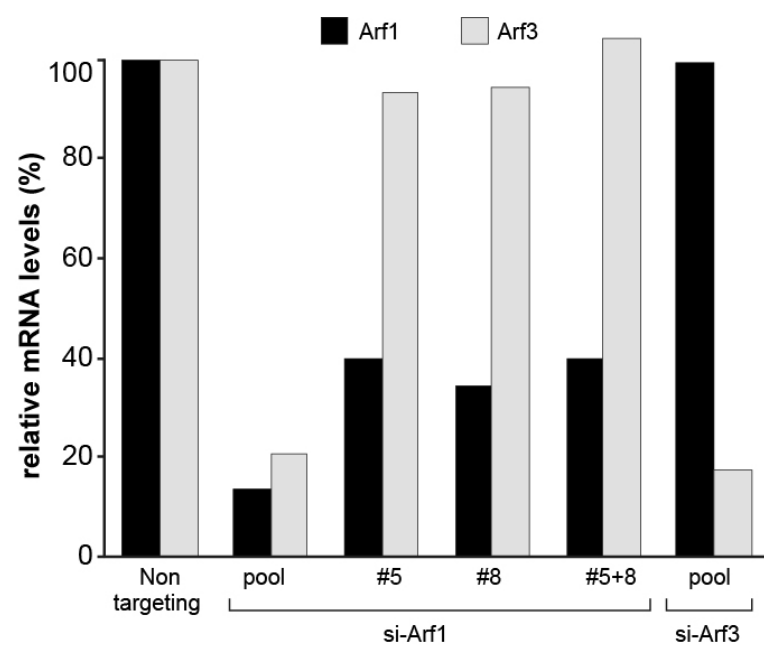


Fig S1

DISCUSSION DU TRAVAIL

L'inhibition de l'infection HCV par la BFA est due au blocage d'un facteur cellulaire inhibé par la BFA, GBF1, qui s'est montré indispensable à l'étape de réplication de HCV. Par ailleurs, GBF1 a été décrit comme facteur cellulaire nécessaire à la réplication d'autres virus à ARN de polarité positive mais son mécanisme d'action n'a pas été décrit jusqu'à présent. GBF1 est un facteur d'échange nucléotidique qui régule les protéines G de la famille Arf. Ces dernières possèdent plusieurs effecteurs dans plusieurs voies cellulaires de transport, des voies métaboliques (métabolisme lipidique) ainsi que dans la régulation des chaperonnes, des microfilaments d'actine...

Nos résultats antérieurs suggèrent que GBF1 agit dans la maturation ou le fonctionnement de ces complexes de réplication avec aucun impact sur leur formation. En se basant sur ces résultats nous avons émis l'hypothèse que GBF1 serait à l'origine de la régulation d'un lipide ou d'une protéine nécessaire à la réplication.

Afin d'étudier le rôle de GBF1 pendant l'infection HCV, nous avons commencé par chercher s'il existe des déterminants de résistance à la BFA (inhibiteur de GBF1) dans le génome de HCV. La résistance du clone infecté sélectionné avec de la BFA n'est pas déterminée par l'ARN viral. Des expériences supplémentaires ont montré que la clairance de l'infection HCV dans ce clone n'a pas d'effet sur leur résistance à la BFA, indiquant ainsi que l'origine de la résistance de ce clone a une origine cellulaire. Bien que cette technique de sélection n'a pas abouti à trouver des déterminants de résistance à HCV, elle a montré qu'il était possible de sélectionner des cellules non-infectées qui peuvent être résistantes à l'apoptose induite par la BFA. Ces cellules peuvent nous permettre d'étudier GBF1 ainsi que la voie qu'il régule en présence d'une toxicité réduite en présence de BFA.

2 groupes de cellules résistantes ont été sélectionnées :

- Le groupe 1 contenant 2 lignées cellulaires. Les voies cellulaires bloquées par la BFA (la voie de sécrétion des protéines) étaient quasi-insensibles au blocage de cette dernière. D'une manière intéressante l'infection dans ces cellules est encore une fois indépendante de l'inhibition par la BFA. L'origine de cette résistance est due à la présence d'une mutation ponctuelle dans le domaine catalytique *sec7* de GBF1

qui est connue pour inhiber la liaison de la BFA à ce domaine. Ces résultats confirment que GBF1 est le seul facteur cellulaire sensible à la BFA et nécessaire à la réplication de HCV.

- Le groupe 2 contenant 5 lignées cellulaires nommées R3 à R7. L'infection par HCV dans ces cellules était quasiment bloquée et se montrait proche du blocage observé dans les lignées parentales Huh-7 en présence de BFA tandis que les voies cellulaires inhibées (la voie de sécrétion des protéines) par la BFA étaient partiellement fonctionnelles dans les mêmes conditions. L'origine de résistance à la BFA dans ces cellules est encore inconnue. Ces résultats suggèrent que GBF1 régule le fonctionnement de la voie de sécrétion et de la réplication virale par deux mécanismes différents.

GBF1 est un facteur d'échange nucléotidique des protéines G de la famille Arf de 206 kDa environ contenant plusieurs domaines. Son domaine catalytique *sec7* contient des motifs conservés qui interagissent avec les protéines G de la famille Arf. En 2010, il a été décrit que pour le poliovirus qui nécessite GBF1 comme facteur cellulaire pour sa réplication, le domaine catalytique *sec7* n'était pas indispensable pour la réplication de ce virus. Seulement les 710 premiers acides aminés de GBF1 (dépourvus de *sec7*) du côté N-terminal, étaient suffisants pour restaurer l'infection en présence de BFA mais n'avaient aucun effet sur les voies régulées par la BFA notamment la voie de sécrétion qui elle requiert le domaine catalytique *sec7*. La construction minimale supportant la réplication du poliovirus contient les domaines conservés DCB et HUS. Il est possible que cette construction tronquée fonctionne dans l'infection poliovirus en recrutant des protéines virales et cellulaires capables d'interagir avec ces deux domaines. Concernant HCV nous avons mené des expériences en utilisant les mêmes mutants de délétion de GBF1. Aucun mutant à l'exception de GBF1 sauvage ou du mutant de résistance à la BFA (M832L) n'a été capable de restaurer l'infection HCV en présence de BFA. Les mêmes résultats ont été observés en regardant la voie de sécrétion des protéines. Seule la surexpression de GBF1 sauvage ou de l'expression du mutant de résistance à la BFA (M832L) restaurait la sécrétion en présence de BFA. La régulation de la voie de sécrétion est dépendante de l'activation de protéines Arf par GBF1, ces résultats indiquent donc que pour HCV, le mécanisme d'action de GBF1 passe aussi par l'activation d'un membre de la famille Arf. Comme la régulation de la sécrétion et de la réplication virale procèdent probablement par des mécanismes distincts, on a pu faire

l'hypothèse que ces deux fonctions de GBF1 étaient effectuées soit par des Arfs différents, soit par des effecteurs de Arf différents.

Pour confirmer l'intervention de protéines Arfs dans la réplication virale, nous avons étudié l'impact de l'inhibition de ArfGAP1, qui est un autre régulateur de l'activité des Arf. Nous avons inhibé la fonction de ArfGAP1 avec un inhibiteur spécifique : le QS11. Nous avons observé une inhibition dose-dépendante de l'infection HCV en présence de cet inhibiteur. Des expériences supplémentaires ont montré que l'inhibition de l'infection HCV n'était pas due à un effet sur l'entrée virale, et que QS11 n'induisait aucune toxicité aux doses employées, mais qu'elle était vraiment spécifique de l'étape de réplication. Ces résultats suggèrent que l'action de GBF1 et de ArfGAP sur la réplication HCV se fait probablement en activant une protéine G Arf. La protéine Arf1 a déjà été décrite comme nécessaire à la réplication de HCV, de ce fait nous avons exprimé les 2 dominants négatifs de la protéine Arf1 qui bloquent chacun la protéine dans un état constitutivement inactif ou constitutivement actif. De manière intéressante, les 2 mutants bloquent l'infection HCV dans les cellules indiquant qu'un cycle de régulation des Arf est nécessaire et non pas seulement la forme active liée à la GTP, comme cela était déjà suggéré par les résultats des expériences avec l'inhibiteur de ArfGAP1.

Nous avons ensuite recherché parmi les protéines Arf exprimées dans les cellules humaines et sensibles à l'inhibition de la BFA, celles qui étaient nécessaires à la réplication HCV. En effet la déplétion par interférence à l'ARN de Arf1, Arf3, Arf4 et Arf5 montre un effet faible sur l'infection HCV, qui a pu être ensuite expliqué par un phénomène de compensation observé entre Arf1 et Arf4. La déplétion de Arf1 dans les cellules induit une surexpression transcriptionnelle de Arf4. Afin de contourner cet effet compensateur entre les protéines Arf, et parce que les protéines Arfs peuvent avoir des fonctions redondantes ou fonctionner par paires (Volpicelli-Daley 2005), nous avons aussi analysé l'effet de la déplétion simultanée des protéines Arf sur l'infection HCV. Le couple Arf4 et Arf5 (class II) s'est montré nécessaire à la réplication de HCV. Pour l'instant le mécanisme d'action de cette paire d'Arf est encore l'objet d'hypothèses. Le rôle de ces 2 protéines pendant l'infection peut être simultané (en formant un couple actif), successif (l'un activant l'autre) ou bien résultant d'une redondance d'action entre ces deux protéines. Il n'est pas facile de déterminer expérimentalement quelle est la situation réelle.

Nous avons ensuite pu voir que Arf4 et Arf5 colocalisent avec GBF1 dans le cis-Golgi, ce qui est compatible avec un rôle de facteur d'échange pour GBF1 envers ces 2 protéines Arf. Des expériences semblables sont en cours dans le cadre de cellules infectées pour déterminer l'association éventuelle de Arf4 et/ou Arf5 aux complexes de réplication de HCV.

Les protéines G de la famille Arf sont connues pour pouvoir activer plusieurs familles d'effecteurs qui régulent des voies cellulaires clés notamment les vésicules de transport COP I, des enzymes du métabolisme lipidique et les microfilaments d'actine... De ce fait nous avons analysé l'effet de la déplétion des 2 protéines Arf de classe II sur la morphologie des compartiments cellulaires sensibles au blocage de GBF1 par la BFA, en prenant comme contrôle les protéines Arf1 et Arf4 qui semblent agir ensemble. D'une manière intéressante la morphologie du cis-Golgi suite à la déplétion de Arf1 et de Arf4 était semblable à celle observée avec la BFA ou la déplétion de GBF1, tandis que la déplétion de Arf4 et de Arf5 montre un cis-Golgi plus compact que le contrôle. Il semble que la paire Arf1-Arf4 est un effecteur de GBF1 qui régule les fonctions cellulaires telles que la voie de sécrétion des protéines ainsi que la morphologie du Golgi. D'autre part, la paire Arf4-Arf5 semble être un effecteur de GBF1 agissant dans la réplication de la réplication de HCV. GBF1 semble donc réguler différentes fonctions par l'intermédiaire de différentes paires de protéines Arf.

Du fait de la régulation du métabolisme lipidique par les protéines Arf et de l'importance du métabolisme lipidique dans l'infection HCV, nous avons étudié l'effet de la déplétion de Arf4 et Arf5 sur les gouttelettes lipidiques puisqu'elles jouent un rôle clé dans le cycle de HCV. La déplétion de Arf4 et Arf5 montre une accumulation de ces structures à la périphérie de la cellule, parfois dans un prolongement de la cellule. Cette morphologie ressemble à celle observée avec un traitement BFA ou suite à la déplétion de GBF1. Nous avons regardé par ailleurs l'effet de la déplétion de Arf4 et Arf5 sur la voie de sécrétion, qui s'est montrée affectée pour la déplétion de Arf1 et Arf4. Aucun effet sur la sécrétion n'a été observé avec la déplétion de Arf4 et Arf5 validant ainsi l'hypothèse que GBF1 possède 2 fonctions indépendantes régulées par le domaine catalytique sec7 et qui se traduisent par un effet sur des protéines Arf différentes pour chaque cas.

L'effet de la BFA, de la déplétion de GBF1 et de la déplétion de la paire Arf4-Arf5 sur la morphologie des gouttelettes lipidiques suggère qu'une régulation du métabolisme

lipidique est réalisée par cette voie GBF1-Arf4/5 qui pourrait être importante pour la synthèse ou le transport d'un lipide nécessaire au début de l'étape de réplication de HCV. Des expériences supplémentaires sur le métabolisme lipidique sont en cours pour essayer de déterminer quelles enzymes de ce métabolisme sont régulées par Arf4/5 et qui peuvent être nécessaires pour la réplication de HCV. Il a déjà été décrit que l'effet de la BFA sur l'infection était d'autant plus fort au début de la réplication et que la BFA avait un effet d'inhibition faible sur la réplication déjà établie dans les cellules. Des expériences sont en cours pour essayer de déterminer si la déplétion de Arf4/5 montre un effet semblable. Finalement nous allons investiguer le mécanisme par lequel le couple Arf4/5 est nécessaire pour la réplication de HCV.

Le mécanisme par lequel Arf4/5 intervient pendant la réplication de HCV pourrait aussi être important pour d'autres virus utilisant GBF1 pour leur réplication. Par ailleurs il pourrait servir de base pour d'éventuelles actions antivirales ciblant spécifiquement la cellule infectée.

BIBLIOGRAPHIE

- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. & Zhang, Q. X. (1999).** Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 12766–12771.
- Aguilera-Romero, A., Kaminska, J., Spang, A., Riezman, H. & Muñoz, M. (2008).** The yeast p24 complex is required for the formation of COPI retrograde transport vesicles from the Golgi apparatus. *J Cell Biol* **180**, 713–720. Rockefeller Univ Press.
- Aizaki, H., Lee, K.-J., Sung, V. M. H., Ishiko, H. & Lai, M. M. C. (2004).** Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* **324**, 450–461.
- Akazawa, D., Date, T., Morikawa, K., Murayama, A., Miyamoto, M., Kaga, M., Barth, H., Baumert, T. F., Dubuisson, J. & Wakita, T. (2007).** CD81 Expression Is Important for the Permissiveness of Huh7 Cell Clones for Heterogeneous Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* **81**, 5036–5045.
- Albecka, A., Belouzard, S., Op de Beeck, A., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., Tercé, F., Duverlie, G., Rouillé, Y. & Dubuisson, J. (2012).** Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* **55**, 998–1007.
- Ali, N. & Siddiqui, A. (1997).** The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 2249–2254.
- Alsaleh, K., Delavalle, P.-Y., Pillez, A., Duverlie, G., Descamps, V., Rouillé, Y., Dubuisson, J. & Wychowski, C. (2010).** Identification of basic amino acids at the N-terminal end of the core protein that are crucial for hepatitis C virus infectivity. *Journal of Virology* **84**, 12515–12528.
- Anders, N. & Jürgens, G. (2008).** Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3433–3445.
- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J. L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G. & Lotteau, V. (2002).** Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *Journal of Virology* **76**, 6919–6928.
- Andréo, U., Maillard, P., Kalinina, O., Walic, M., Meurs, E., Martinot, M., Marcellin, P. & Budkowska, A. (2007).** Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cellular Microbiology* **9**, 2445–2456.
- Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Aridor, M. & Fish, K. N. (n.d.).** ... proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains." Science 296 (5574): 1821-5. Antonny, B.(2006). "Membrane deformation by protein coats." Curr Opin Cell *Nature*.
- Appel, N., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R. (2005).** Mutational Analysis of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A: Potential Role of Differential Phosphorylation in RNA Replication and Identification of a Genetically Flexible Domain. *Journal of Virology* **79**, 3187–3194.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U. & Bartenschlager, R. (2008).** Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly. *PLoS Pathog* **4**, e1000035 (D. Moradpour, Ed.).
- Asp, L., Kartberg, F., Fernandez-Rodriguez, J., Smedh, M., Elsnér, M., Laporte, F.,**

- Bárcena, M., Jansen, K. A., Valentijn, J. A. & other authors. (2009).** Early stages of Golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. *Mol Biol Cell* **20**, 780–790.
- Atoom, A. M., Taylor, N. G. A. & Russell, R. S. (2014).** The elusive function of the hepatitis C virus p7 protein. *Virology* **462-463**, 377–387.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., Wilkinson, T. & Koch, J. O. (1995).** Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *Journal of Virology* **69**, 7519–7528.
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V. & André, P. (2011).** Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in Microbiology* **19**, 95–103. Elsevier Ltd.
- Barth, H. (2003).** Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 41003–41012.
- Barth, H., Schnober, E. K., Zhang, F., Linhardt, R. J., Depla, E., Boson, B., Cosset, F. L., Patel, A. H., Blum, H. E. & Baumert, T. F. (2006).** Viral and Cellular Determinants of the Hepatitis C Virus Envelope-Heparan Sulfate Interaction. *Journal of Virology* **80**, 10579–10590.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F. L. (2003a).** Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1-E2 Envelope Protein Complexes **197**, 633–642.
- Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J.-C., Granier, C., Engle, R. E., Blackwelder, W. C., Emerson, S. U., Cosset, F.-L. & Purcell, R. H. (2003b).** In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 14199–14204. National Acad Sciences.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A. & Cosset, F.-L. (2003c).** Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* **278**, 41624–41630.
- Bashkirov, P. V., Akimov, S. A., Evseev, A. I., Schmid, S. L., Zimmerberg, J. & Frolov, V. A. (2008).** GTPase Cycle of Dynamin Is Coupled to Membrane Squeeze and Release, Leading to Spontaneous Fission. *Cell* **135**, 1276–1286.
- Basu, A., Kanda, T., Beyene, A., Saito, K., Meyer, K. & Ray, R. (2007).** Sulfated Homologues of Heparin Inhibit Hepatitis C Virus Entry into Mammalian Cells. *Journal of Virology* **81**, 3933–3941.
- Beaumont, E., Patient, R., Hourieux, C., Dimier-Poisson, I. & Roingeard, P. (2013).** Chimeric hepatitis B virus/hepatitis C virus envelope proteins elicit broadly neutralizing antibodies and constitute a potential bivalent prophylactic vaccine. *Hepatology* **57**, 1303–1313.
- Belov, G. A., Feng, Q., Nikovics, K., Jackson, C. L. & Ehrenfeld, E. (2008).** A Critical Role of a Cellular Membrane Traffic Protein in Poliovirus RNA Replication. *PLoS Pathog* **4**, e1000216 (R. Andino, Ed.).
- Belov, G. A., Kovtunovych, G., Jackson, C. L. & Ehrenfeld, E. (2010).** Poliovirus replication requires the N-terminus but not the catalytic Sec7 domain of ArfGEF GBF1. *Cellular Microbiology* **12**, 1463–1479.
- Berger, K. L., Cooper, J. D., Heaton, N. S., Yoon, R., Oakland, T. E., Jordan, T. X., Mateu, G., Grakoui, A. & Randall, G. (2009).** Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 7577–7582. National Acad Sciences.
- Bienz, K., Egger, D., Troxler, M. & Pasamontes, L. (1990).** Structural organization of

- poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *Journal of Virology* **64**, 1156–1163.
- Bienz, K., Egger, D., Pfister, T. & Troxler, M. (1992).** Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. *Journal of Virology* **66**, 2740–2747. *Am Soc Microbiol*.
- Bissig, K.-D., Wieland, S. F., Tran, P., Isogawa, M., Le, T. T., Chisari, F. V. & Verma, I. M. (2010).** Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest* **120**, 924–930.
- Bitzegeio, J., Bankwitz, D., Hueging, K., Haid, S., Brohm, C., Zeisel, M. B., Herrmann, E., Iken, M., Ott, M. & other authors. (2010).** Adaptation of Hepatitis C Virus to Mouse CD81 Permits Infection of Mouse Cells in the Absence of Human Entry Factors. *PLoS Pathog* **6**, e1000978 (M. S. Diamond, Ed.).
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. & Rouillé, Y. (2006).** Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology* **80**, 6964–6972.
- Blight, K. J. (2000).** Efficient Initiation of HCV RNA Replication in Cell Culture. *Science* **290**, 1972–1974.
- Boal, F., Guetzoyan, L., Sessions, R. B., Zeghouf, M., Spooner, R. A., Lord, J. M., Cherfils, J., Clarkson, G. J., Roberts, L. M. & Stephens, D. J. (2010).** LG186: An inhibitor of GBF1 function that causes Golgi disassembly in human and canine cells. *Traffic* **11**, 1537–1551.
- Borawski, J., Troke, P., Puyang, X., Gibaja, V., Zhao, S., Mickanin, C., Leighton-Davies, J., Wilson, C. J., Myer, V. & other authors. (2009).** Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *Journal of Virology* **83**, 10058–10074.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F. & Lavergne, J. P. (2005).** Hepatitis C Virus Core Protein Is a Dimeric Alpha-Helical Protein Exhibiting Membrane Protein Features. *Journal of Virology* **79**, 11353–11365.
- Boulant, S., Douglas, M. W., Moody, L., Budkowska, A., Targett-Adams, P. & McLauchlan, J. (2008).** Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic* **9**, 1268–1282.
- Bowen, D. G. & Walker, C. M. (2005).** Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature Cell Biology* **436**, 946–952.
- Boyer, A., Dumans, A., Beaumont, E., Etienne, L., Roingeard, P. & Meunier, J.-C. (2014).** The association of hepatitis C virus glycoproteins with apolipoproteins e and B early in assembly is conserved in lipoviral particles. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 18904–18913.
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wölk, B., Hellings, J. A., Blum, H. E., Penin, F. & Moradpour, D. (2002).** An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* **277**, 8130–8139.
- Brazzoli, M., Bianchi, A., Filippini, S., Weiner, A., Zhu, Q., Pizza, M. & Crotta, S. (2008).** CD81 Is a Central Regulator of Cellular Events Required for Hepatitis C Virus Infection of Human Hepatocytes. *Journal of Virology* **82**, 8316–8329.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F. A. & De Francesco, R. (2002).** Structural Analysis of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase in Complex with Ribonucleotides. *Journal of Virology* **76**, 3482–3492.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De**

- Francesco, R. & Rey, F. A. (1999).** Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 13034–13039.
- Brimacombe, C. L., Grove, J., Meredith, L. W., Hu, K., Syder, A. J., Flores, M. V., Timpe, J. M., Krieger, S. E., Baumert, T. F. & other authors. (2010).** Neutralizing Antibody-Resistant Hepatitis C Virus Cell-to-Cell Transmission. *Journal of Virology* **85**, 596–605.
- Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Lorenz, I. C., Patel, A., Penin, F., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2009).** Characterization of determinants important for hepatitis C virus p7 function in morphogenesis by using trans-complementation. *Journal of Virology* **83**, 11682–11693.
- Buck, M. (2008).** Direct infection and replication of naturally occurring hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3 and 4 in normal human hepatocyte cultures. *PLoS ONE* **3**, e2660–e2660.
- Carpp, L. N., Rogers, R. S., Moritz, R. L. & Aitchison, J. D. (2014).** Quantitative proteomic analysis of host-virus interactions reveals a role for GBF1 in dengue infection. *Mol Cell Proteomics*.
- Carrere-Kremer, S. (2004).** Regulation of Hepatitis C Virus Polyprotein Processing by Signal Peptidase Involves Structural Determinants at the p7 Sequence Junctions. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 41384–41392.
- Catanese, M. T., Ansuini, H., Graziani, R., Huby, T., Moreau, M., Ball, J. K., Paonessa, G., Rice, C. M., Cortese, R. & other authors. (2010).** Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants. *Journal of Virology* **84**, 34–43.
- Catanese, M. T., Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T. J., Andrus, L., Rice, W. J., Silvestry, M., Kuhn, R. J. & Rice, C. M. (2013).** Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 9505–9510.
- Chang, K.-S. & Luo, G. (2006).** The polypyrimidine tract-binding protein (PTB) is required for efficient replication of hepatitis C virus (HCV) RNA. *Virus Res* **115**, 1–8.
- Chatel-Chaix, L., Melançon, P., Racine, M. E., Baril, M. & Lamarre, D. (2011).** Y-Box-Binding Protein 1 Interacts with Hepatitis C Virus NS3/4A and Influences the Equilibrium between Viral RNA Replication and Infectious Particle Production. *Journal of Virology* **85**, 11022–11037.
- Chen, S. L. & Morgan, T. R. (2006).** The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* **3**, 47–52.
- Cheng, G., Zhong, J. & Chisari, F. V. (2006).** Inhibition of dsRNA-induced signaling in hepatitis C virus-infected cells by NS3 protease-dependent and-independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 8499–8504. National Acad Sciences.
- Cheung, P., Banfield, B. W. & Tufaro, F. (1991).** Brefeldin A arrests the maturation and egress of herpes simplex virus particles during infection. *Journal of Virology* **65**, 1893–1904.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Ralston, R., Weiner, A., Chien, D., Van Nest, G., Han, J., Berger, K., Thudium, K. & Kuo, C. (1994).** Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 1294–1298.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989).** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359–362.
- Ciczora, Y., Callens, N., Penin, F., Pecheur, E. I. & Dubuisson, J. (2007).**

- Transmembrane Domains of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins: Residues Involved in E1E2 Heterodimerization and Involvement of These Domains in Virus Entry. *Journal of Virology* **81**, 2372–2381.
- Claude, A., Zhao, B. P., Kuziemy, C. E., Dahan, S., Berger, S. J., Yan, J. P., Arnold, A. D., Sullivan, E. M. & Melançon, P. (1999).** GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J Cell Biol* **146**, 71–84.
- Cocquerel, L., Voisset, C. & Dubuisson, J. (2006).** Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* **87**, 1075–1084.
- Cormier, E. G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R. J., Gardner, J. P. & Dragic, T. (2004).** CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 7270–7274.
- Cosson, P. & Letourneur, F. (1994).** Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* **263**, 1629–1631. American Association for the Advancement of Science.
- D'Souza-Schorey, C. & Chavrier, P. (2006).** ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 347–358.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M. & Dubuisson, J. (1996).** Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *Journal of Virology* **71**, 697–704.
- Delgrange, D., Pillez, A., Castelain, S., Cocquerel, L., Rouille, Y., Dubuisson, J., Wakita, T., Duverlie, G. & Wychowski, C. (2007).** Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *Journal of General Virology* **88**, 2495–2503.
- Deng, Y., Golinelli-Cohen, M.-P., Smirnova, E. & Jackson, C. L. (2009).** A COPI coat subunit interacts directly with an early-Golgi localized Arf exchange factor. *EMBO Rep* **10**, 58–64. EMBO Press.
- Diviney, S., Tuplin, A., Struthers, M., Armstrong, V., Elliott, R. M., Simmonds, P. & Evans, D. J. (2008).** A Hepatitis C Virus cis-Acting Replication Element Forms a Long-Range RNA-RNA Interaction with Upstream RNA Sequences in NS5B. *Journal of Virology* **82**, 9008–9022.
- Domitrovich, A. M., Diebel, K. W., Ali, N., Sarker, S. & Siddiqui, A. (2005).** Role of La autoantigen and polypyrimidine tract-binding protein in HCV replication. *Virology* **335**, 72–86.
- Donaldson, J. G., Finazzi, D. & Klausner, R. D. (1992).** Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* **360**, 350–352.
- Donaldson, J. G. & Jackson, C. L. (2011).** ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 362–375.
- Dreux, M., Thi, V. L. D., Fresquet, J., Guérin, M., Julia, Z., Verney, G., Durantel, D., Zoulim, F., Lavillette, D. & other authors. (2009).** Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PLoS Pathog* **5**, e1000310–e1000310.
- Drummer, H. E., Maerz, A. & Pountourios, P. (2003).** Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett* **546**, 385–390.
- Duijsings, D., Lanke, K. H. W., van Dooren, S. H. J., van Dommelen, M. M. T., Wetzels, R., de Mattia, F., Wessels, E. & van Kuppeveld, F. J. M. (2009).** Differential membrane association properties and regulation of class I and class II Arfs. *Traffic*

- 10, 316–323.
- Durán, R. V. & Hall, M. N. (2012).** Regulation of TOR by small GTPases. *Nature Publishing Group* **13**, 121–128. Nature Publishing Group.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. & Bienz, K. (2002).** Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *Journal of Virology* **76**, 5974–5984.
- Einav, S., Elazar, M., Danieli, T. & Glenn, J. S. (2004).** A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *Journal of Virology* **78**, 11288–11295.
- Elazar, M., Cheong, K. H., Liu, P., Greenberg, H. B., Rice, C. M. & Glenn, J. S. (2003).** Amphipathic Helix-Dependent Localization of NS5A Mediates Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology* **77**, 6055–6061.
- Evans, M. J., Hahn, von, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wölk, B., Hatziioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D. & Rice, C. M. (2007).** Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801–805.
- Evans, M. J., Rice, C. M. & Goff, S. P. (2004).** Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 13038–13043. National Acad Sciences.
- Farci, P., London, W. T., Wong, D. C., Dawson, G. J., Vallari, D. S., Engle, R. & Purcell, R. H. (1992).** The natural history of infection with hepatitis C virus (HCV) in chimpanzees: comparison of serologic responses measured with first- and second-generation assays and relationship to HCV viremia. *J INFECT DIS* **165**, 1006–1011.
- Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzer, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H. J. & Purcell, R. H. (1996).** Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 15394–15399.
- Farhat, R., Goueslain, L., Wychowski, C., Belouzard, S., Fénéant, L., Jackson, C. L., Dubuisson, J. & Rouillé, Y. (2013).** Hepatitis C virus replication and Golgi function in brefeldin A-resistant hepatoma-derived cells. *PLoS ONE* **8**, e74491.
- Feld, J. J. & Hoofnagle, J. H. (2005).** Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature Cell Biology* **436**, 967–972.
- Fénéant, L., Levy, S. & Cocquerel, L. (2014).** CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. *Viruses* **6**, 535–572.
- Ferraris, P., Beaumont, E., Uzbekov, R., Brand, D., Gaillard, J., Blanchard, E. & Roingeard, P. (2013).** Sequential biogenesis of host cell membrane rearrangements induced by hepatitis C virus infection. *Cell Mol Life Sci* **70**, 1297–1306.
- Ferraris, P., Blanchard, E. & Roingeard, P. (2010).** Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *Journal of General Virology* **91**, 2230–2237.
- Flint, M., Hahn, von, T., Zhang, J., Farquhar, M., Jones, C. T., Balfe, P., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2006).** Diverse CD81 Proteins Support Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* **80**, 11331–11342.
- Fofana, I., Krieger, S. E., Grunert, F., Glaubien, S., Xiao, F., Kremer, S. F., Soulier, E., Royer, C., Thumann, C. & other authors. (2010).** BASIC—LIVER, PANCREAS, AND BILIARY TRACT. *YGAST* **139**, 953–964.e4. Elsevier Inc.

- Fournier, C. C., Sureau, C. C., Coste, J. J., Ducos, J. J., Pageaux, G. G., Larrey, D. D., Domergue, J. J. & Maurel, P. P. (1998).** In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol* **79** (Pt 10), 2367–2374.
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. & Paris, S. (1996).** Myristoylation-facilitated binding of the G protein ARF1 to membrane phospholipids is required for its activation by a soluble nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* **271**, 1573–1578. ASBMB.
- Frank, C., Mohamed, M. K., Strickland, G. T., Lavanchy, D., Arthur, R. R., Magder, L. S., Khoby, El, T., Abdel-Wahab, Y., Aly Ohn, E. S. & other authors. (2000).** The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* **355**, 887–891.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N. & Bartenschlager, R. (2001).** Sequences in the 5' Nontranslated Region of Hepatitis C Virus Required for RNA Replication. *Journal of Virology* **75**, 12047–12057.
- Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J.-P. & Bartenschlager, R. (2005).** Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *Journal of Virology* **79**, 380–392.
- Galmozzi, E., Aghemo, A. & Colombo, M. (2012).** Medical Hypotheses. *Medical Hypotheses* **79**, 471–473. Elsevier Ltd.
- Gao, L., Aizaki, H., He, J.-W. & Lai, M. M. C. (2004).** Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *Journal of Virology* **78**, 3480–3488.
- García-Mata, R., Szul, T., Alvarez, C. & Sztul, E. (2003).** ADP-ribosylation factor/COPI-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Mol Biol Cell* **14**, 2250–2261. Am Soc Cell Biol.
- Garrone, P., Fluckiger, A. C., Mangeot, P. E., Gauthier, E., Dupeyrot-Lacas, P., Mancip, J., Cangialosi, A., Chene, Du, I., LeGrand, R. & other authors. (2011).** A Prime-Boost Strategy Using Virus-Like Particles Pseudotyped for HCV Proteins Triggers Broadly Neutralizing Antibodies in Macaques. *Science Translational Medicine* **3**, 94ra71–94ra71.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W. & Chisari, F. V. (2008).** Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *Journal of Virology* **82**, 2120–2129.
- Gastaminza, P., Kapadia, S. B. & Chisari, F. V. (2006).** Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *Journal of Virology* **80**, 11074–11081.
- Gentsch, J., Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Menzel, N., Vieyres, G., Perin, P. M., Frentzen, A., Kaderali, L. & Pietschmann, T. (2013).** hepatitis c Virus p7 is critical for capsid assembly and envelopment. *PLoS Pathog* **9**, e1003355.
- Germi, R. L., Crance, J.-M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W. H., Zarski, J.-P. & Drouet, E. (2002).** Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J Med Virol* **68**, 206–215.
- Gillingham, A. K. & Munro, S. (2007).** The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 579–611.
- Goffard, A., Callens, N., Bartosch, B., Wychowski, C., Cosset, F. L., Montpellier, C. & Dubuisson, J. (2005).** Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus

- Envelope Glycoproteins. *Journal of Virology* **79**, 8400–8409.
- Gommel, D. U., Memon, A. R., Heiss, A., Lottspeich, F., Pfannstiel, J., Lechner, J., Reinhard, C., Helms, J. B., Nickel, W. & Wieland, F. T. (2001).** Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *EMBO J* **20**, 6751–6760.
- Gong, Q., Cheng, M., Chen, H., Liu, X., Si, Y., Yang, Y., Yuan, Y., Jin, C., Yang, W. & other authors. (2011).** Phospholipid scramblase 1 mediates hepatitis C virus entry into host cells. *FEBS Lett* **585**, 2647–2652. Federation of European Biochemical Societies.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K. & Moradpour, D. (2003).** Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *Journal of Virology* **77**, 5487–5492.
- Gottwein, J. M., Scheel, T. K. H., Jensen, T. B., Lademann, J. B., Prentoe, J. C., Knudsen, M. L., Hoegh, A. M. & Bukh, J. (2009).** Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* **49**, 364–377.
- Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingeard, P., Descamps, V., Duverlie, G., Ciczora, Y., Wychowski, C., Dubuisson, J. & Rouillé, Y. (2010).** Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology* **84**, 773–787.
- Gouttenoire, J., Castet, V., Montserret, R., Arora, N., Raussens, V., Ruyschaert, J. M., Diesis, E., Blum, H. E., Penin, F. & Moradpour, D. (2009a).** Identification of a Novel Determinant for Membrane Association in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B. *Journal of Virology* **83**, 6257–6268.
- Gouttenoire, J., Montserret, R., Kennel, A., Penin, F. & Moradpour, D. (2009b).** An Amphipathic α -Helix at the C Terminus of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Mediates Membrane Association. *Journal of Virology* **83**, 11378–11384.
- Gouttenoire, J., Roingeard, P., Penin, F. & Moradpour, D. (2010).** Amphipathic α -Helix AH2 Is a Major Determinant for the Oligomerization of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B. *Journal of Virology* **84**, 12529–12537.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1993).** Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *Journal of Virology* **67**, 1385–1395.
- Grebely, J., Matthews, G. V. & Dore, G. J. (2011).** Treatment of acute HCV infection. *Nature Publishing Group* **8**, 265–274. Nature Publishing Group.
- Griffin, S. D. C. (2004).** A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *Journal of General Virology* **85**, 451–461.
- Hahn, von, T., Yoon, J. C., Alter, H., Rice, C. M., Rehmann, B., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2007).** Hepatitis C Virus Continuously Escapes From Neutralizing Antibody and T-Cell Responses During Chronic Infection In Vivo. *Gastroenterology* **132**, 667–678.
- Haid, S., Pietschmann, T. & Pecheur, E. I. (2009).** Low pH-dependent Hepatitis C Virus Membrane Fusion Depends on E2 Integrity, Target Lipid Composition, and Density of Virus Particles. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 17657–17667.
- Hamamoto, I., Nishimura, Y., Okamoto, T., Aizaki, H., Liu, M., Mori, Y., Abe, T., Suzuki, T., Lai, M. M. C. & other authors. (2005).** Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B. *Journal of*

- Virology* **79**, 13473–13482.
- Hanoulle, X., Badillo, A., Wieruszeski, J. M., Verdegem, D., Landrieu, I., Bartenschlager, R., Penin, F. & Lippens, G. (2009).** Hepatitis C Virus NS5A Protein Is a Substrate for the Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerase Activity of Cyclophilins A and B. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 13589–13601.
- Helle, F., Goffard, A., Morel, V., Duverlie, G., McKeating, J., Keck, Z. Y., Fong, S., Penin, F., Dubuisson, J. & Voisset, C. (2007).** The Neutralizing Activity of Anti-Hepatitis C Virus Antibodies Is Modulated by Specific Glycans on the E2 Envelope Protein. *Journal of Virology* **81**, 8101–8111.
- Henke, J. I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C. G., Fehr, C., Jünemann, C. & Niepmann, M. (2008).** microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* **27**, 3300–3310.
- Hoffman, B. & Liu, Q. (2011).** Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals. *Liver International* **31**, 1449–1467.
- Honda, A., Al-Awar, O. S., Hay, J. C. & Donaldson, J. G. (2005).** Targeting of Arf-1 to the early Golgi by membrin, an ER-Golgi SNARE. *J Cell Biol* **168**, 1039–1051.
- Hoofnagle, J. H., Mullen, K. D., Jones, D. B., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Peters, M., Waggoner, J. G., Park, Y. & Jones, E. A. (1986).** Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* **315**, 1575–1578.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2003).** Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 7271–7276.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D. M., Li, W., Chen, Y., Gale, M. & Ye, J. (2007).** Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 5848–5853. National Acad Sciences.
- Huang, L., Hwang, J., Sharma, S. D., Hargittai, M. R. S., Chen, Y., Arnold, J. J., Raney, K. D. & Cameron, C. E. (2005).** Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* **280**, 36417–36428.
- Hügler, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Kräusslich, H.-G., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2001).** The Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Is an Integral Endoplasmic Reticulum Membrane Protein. *Virology* **284**, 70–81.
- Ikeda, M., Yi, M., Li, K. & Lemon, S. M. (2002).** Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *Journal of Virology* **76**, 2997–3006.
- Irurzun, A., Pérez, L. & Carrasco, L. (1993).** Brefeldin A blocks protein glycosylation and RNA replication of vesicular stomatitis virus. *FEBS Lett* **336**, 496–500.
- Ito, T. & Lai, M. M. (1999).** An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence. *Virology* **254**, 288–296.
- Ito, T., Mukaigawa, J., Zuo, J., Hirabayashi, Y., Mitamura, K. & Yasui, K. (1996).** Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *J Gen Virol* **77** (Pt 5), 1043–1054.
- Jackson, C. L. & Casanova, J. E. (2000).** Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* **10**, 60–67.

- Ji, H., Fraser, C. S., Yu, Y., Leary, J. & Doudna, J. A. (2004).** Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 16990–16995. National Acad Sciences.
- Jiang, J., Cun, W., Wu, X., Shi, Q., Tang, H. & Luo, G. (2012).** Hepatitis C Virus Attachment Mediated by Apolipoprotein E Binding to Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology* **86**, 7256–7267.
- Jiang, J. & Luo, G. (2009).** Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *Journal of Virology* **83**, 12680–12691.
- Jones, C. T., Murray, C. L., Eastman, D. K., Tassello, J. & Rice, C. M. (2007).** Hepatitis C Virus p7 and NS2 Proteins Are Essential for Production of Infectious Virus. *Journal of Virology* **81**, 8374–8383.
- Jones, D. M., Patel, A. H., Targett-Adams, P. & McLauchlan, J. (2009).** The Hepatitis C Virus NS4B Protein Can trans-Complement Viral RNA Replication and Modulates Production of Infectious Virus. *Journal of Virology* **83**, 2163–2177.
- Jopling, C. L., Schütz, S. & Sarnow, P. (2008).** Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host & Microbe* **4**, 77–85.
- Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. & Sarnow, P. (2005).** Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**, 1577–1581.
- Kahn, R. A., Bruford, E., Inoue, H., Logsdon, J. M., Nie, Z., Premont, R. T., Randazzo, P. A., Satake, M., Theibert, A. B. & other authors. (2008).** Consensus nomenclature for the human ArfGAP domain-containing proteins. *The Journal of Cell Biology* **182**, 1039–1044.
- Khan, A. G., Whidby, J., Miller, M. T., Scarborough, H., Zatorski, A. V., Cygan, A., Price, A. A., Yost, S. A., Bohannon, C. D. & other authors. (2014).** Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature* **509**, 381–384.
- Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S. & Kohara, M. (1994).** Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* **75 (Pt 7)**, 1755–1760.
- Kapadia, S. B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J. A. & Chisari, F. V. (2007).** Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *Journal of Virology* **81**, 374–383.
- Kapadia, S. B. & Chisari, F. V. (2005).** Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 2561–2566.
- Kato, T., Matsumura, T., Heller, T., Saito, S., Sapp, R. K., Murthy, K., Wakita, T. & Liang, T. J. (2007).** Production of Infectious Hepatitis C Virus of Various Genotypes in Cell Cultures. *Journal of Virology* **81**, 4405–4411.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M. & Wakita, T. (2003).** Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* **125**, 1808–1817. Elsevier.
- Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T. & Wakita, T. (2001).** Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient*. *J Med Virol* **64**, 334–339. Wiley Online Library.
- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas Lopez, M.,**

- Lohmann, V., Luban, J. & Bartenschlager, R. (2009).** Essential Role of Cyclophilin A for Hepatitis C Virus Replication and Virus Production and Possible Link to Polyprotein Cleavage Kinetics. *PLoS Pathog* **5**, e1000546 (C. M. Rice, Ed.).
- Kawamoto, K., Yoshida, Y., Tamaki, H., Torii, S., Shinotsuka, C., Yamashina, S. & Nakayama, K. (2002).** GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors, is localized to the cis-Golgi and involved in membrane association of the COPI coat. *Traffic* **3**, 483–495.
- Kim, J., Lee, D. & Choe, J. (1999).** Hepatitis C virus NS5A protein is phosphorylated by casein kinase II. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **257**, 777–781.
- Kim, S.-J., Kim, J.-H., Kim, Y.-G., Lim, H.-S. & Oh, J.-W. (2004).** Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem* **279**, 50031–50041.
- Kim, Y. K., Kim, C. S., Lee, S. H. & Jang, S. K. (2002).** Domains I and II in the 5' Nontranslated Region of the HCV Genome Are Required for RNA Replication. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290**, 105–112.
- Kirchhausen, T. (2000).** Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 187–198.
- Klausner, R. D., Donaldson, J. G. & Lippincott-Schwartz, J. (1992).** Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* **116**, 1071–1080.
- Klein, K. C., Dellos, S. R. & Lingappa, J. R. (2005).** Identification of residues in the hepatitis C virus core protein that are critical for capsid assembly in a cell-free system. *Journal of Virology* **79**, 6814–6826.
- Koch, J. O. & Bartenschlager, R. (1999).** Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *Journal of Virology* **73**, 7138–7146.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1996).** Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *Journal of Virology* **70**, 3363–3371.
- Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (2000).** Hepatitis C Virus-Encoded Enzymatic Activities and Conserved RNA Elements in the 3' Nontranslated Region Are Essential for Virus Replication In Vivo. *Journal of Virology* **74**, 2046–2051.
- Kong, L., Giang, E., Nieusma, T., Kadam, R. U., Cogburn, K. E., Hua, Y., Dai, X., Stanfield, R. L., Burton, D. R. & other authors. (2013).** Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science* **342**, 1090–1094.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R. (2006).** Characterization of the Early Steps of Hepatitis C Virus Infection by Using Luciferase Reporter Viruses. *Journal of Virology* **80**, 5308–5320.
- Krey, T., d'Alayer, J., Kikuti, C. M., Saulnier, A., Damier-Piolle, L., Petitpas, I., Johansson, D. X., Tawar, R. G., Baron, B. & other authors. (2010).** The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog* **6**, e1000762.
- Krieger, N., Lohmann, V. & Bartenschlager, R. (2001).** Enhancement of Hepatitis C Virus RNA Replication by Cell Culture-Adaptive Mutations. *Journal of Virology* **75**, 4614–4624.
- Krieger, S. E., Zeisel, M. B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H. J., Schnober, E. K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C. & other authors. (2010).** Inhibition of hepatitis C virus

- infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* **51**, 1144–1157.
- Kudelko, M., Brault, J.-B., Kwok, K., Li, M. Y., Pardigon, N., Peiris, J. S. M., Bruzzone, R., Desprès, P., Nal, B. & Wang, P. G. (2012).** Class II ADP-ribosylation factors are required for efficient secretion of dengue viruses. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 767–777.
- Lai, C.-K., Jeng, K.-S., Machida, K. & Lai, M. M. C. (2008).** Association of hepatitis C virus replication complexes with microtubules and actin filaments is dependent on the interaction of NS3 and NS5A. *Journal of Virology* **82**, 8838–8848.
- Lai, W. K., Sun, P. J., Zhang, J., Jennings, A., Lalor, P. F., Hubscher, S., McKeating, J. A. & Adams, D. H. (2006).** Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on Human Sinusoidal Endothelium. *The American Journal of Pathology* **169**, 200–208.
- Lal-Nag, M. & Morin, P. J. (2008).** The claudins. *Genome biology* **10**, 235–235.
- Lam, A. M. I. & Frick, D. N. (2006).** Hepatitis C virus subgenomic replicon requires an active NS3 RNA helicase. *Journal of Virology* **80**, 404–411.
- Lancaster, T., Sanders, E., Christie, J. M. L., Brooks, C., Green, S. & Rosenberg, W. M. C. (2002).** Quantitative and functional differences in CD8+ lymphocyte responses in resolved acute and chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* **9**, 18–28.
- Lanford, R. E., Sureau, C., Jacob, J. R., White, R. & Fuerst, T. R. (1994).** Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology* **202**, 606–614.
- Lanke, K. H. W., van der Schaar, H. M., Belov, G. A., Feng, Q., Duijsings, D., Jackson, C. L., Ehrenfeld, E. & van Kuppeveld, F. J. M. (2009).** GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for coxsackievirus B3 RNA replication. *Journal of Virology* **83**, 11940–11949.
- Lavanchy, D. (2011).** Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* **17**, 107–115.
- Lavanchy, D. (2009).** The global burden of hepatitis C. *Liver International* **29**, 74–81.
- Lavillette, D. (2006).** Hepatitis C Virus Glycoproteins Mediate Low pH-dependent Membrane Fusion with Liposomes. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 3909–3917.
- Lavillette, D., Morice, Y., Germanidis, G., Donot, P., Soulier, A., Pagkalos, E., Sakellariou, G., Intrator, L., Bartosch, B. & other authors. (2005a).** Human Serum Facilitates Hepatitis C Virus Infection, and Neutralizing Responses Inversely Correlate with Viral Replication Kinetics at the Acute Phase of Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* **79**, 6023–6034.
- Lavillette, D., Pecheur, E. I., Donot, P., Fresquet, J., Molle, J., Corbau, R., Dreux, M., Penin, F. & Cosset, F. L. (2007).** Characterization of Fusion Determinants Points to the Involvement of Three Discrete Regions of Both E1 and E2 Glycoproteins in the Membrane Fusion Process of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **81**, 8752–8765.
- Lavillette, D., Tarr, A. W., Voisset, C., Donot, P., Bartosch, B., Bain, C., Patel, A. H., Dubuisson, J., Ball, J. K. & Cosset, F.-L. (2005b).** Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* **41**, 265–274.
- Lee, K. J., Choi, J., Ou, J. H. & Lai, M. M. C. (2004).** The C-Terminal Transmembrane Domain of Hepatitis C Virus (HCV) RNA Polymerase Is Essential for HCV Replication In Vivo. *Journal of Virology* **78**, 3797–3802.
- Lee, S. Y., Yang, J.-S., Hong, W., Premont, R. T. & Hsu, V. W. (2005).** ARFGAP1 plays a central role in coupling COPI cargo sorting with vesicle formation. *J Cell Biol* **168**, 281–290.

- Li, H., Yang, X., Yang, G., Hong, Z., Zhou, L., Yin, P., Xiao, Y., Chen, L., Chung, R. T. & Zhang, L. (2014).** Hepatitis C virus NS5A hijacks ARFGAP1 to maintain a phosphatidylinositol 4-phosphate-enriched microenvironment. *Journal of Virology* **88**, 5956–5966.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C. M., Ikeda, M., Ray, S. C., Gale, M., Jr & Lemon, S. M. (2005a).** Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor3 adaptor protein TRIF. *PNAS* 1–6.
- Li, Q., Brass, A. L., Ng, A., Hu, Z., Xavier, R. J., Liang, T. J. & Elledge, S. J. (2009).** A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 16410–16415.
- Li, X.-D., Sun, L., Seth, R. B., Pineda, G. & Chen, Z. J. (2005b).** Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 17717–17722. National Acad Sciences.
- Lindenbach, B. D. (2005).** Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science* **309**, 623–626.
- Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2005).** Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* **436**, 933–938.
- Lindenbach, B. D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A. J., McKeating, J. A., Lanford, R. E., Feinstone, S. M., Major, M. E. & other authors. (2006).** Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 3805–3809.
- Lindenbach, B. D., Prágai, B. M., Montserret, R., Beran, R. K. F., Pyle, A. M., Penin, F. & Rice, C. M. (2007).** The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *Journal of Virology* **81**, 8905–8918.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L. & Klausner, R. D. (1990).** Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* **67**, 601–616.
- Liu, S. (2006).** Insertion and deletion analyses identify regions of non-structural protein 5A of Hepatitis C virus that are dispensable for viral genome replication. *Journal of General Virology* **87**, 323–327.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B. & Wang, T. (2009a).** Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Control Hepatitis C Virus Entry and Are Downregulated during Infection To Prevent Superinfection. *Journal of Virology* **83**, 2011–2014.
- Liu, Z., Yang, F., Robotham, J. M. & Tang, H. (2009b).** Critical role of cyclophilin A and its prolyl-peptidyl isomerase activity in the structure and function of the hepatitis C virus replication complex. *Journal of Virology* **83**, 6554–6565.
- Lohmann, V., Körner, F., Dobierzewska, A. & Bartenschlager, R. (2001).** Mutations in Hepatitis C Virus RNAs Conferring Cell Culture Adaptation. *Journal of Virology* **75**, 1437–1449.
- Lohmann, V., Körner, F., Herian, U. & Bartenschlager, R. (1997).** Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *Journal of Virology* **71**, 8416–8428.
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J. O., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R.**

- (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**, 110–113. American Association for the Advancement of Science.
- Lohmann, V., Roos, A., Körner, F., Koch, J. O. & Bartenschlager, R. (1998).** Biochemical and kinetic analyses of NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *Virology* **249**, 108–118.
- Lorenz, I. C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T. G. & Rice, C. M. (2006).** Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **442**, 831–835.
- Lozach, P. Y., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F. L. & Altmeyer, R. (2004).** C-type Lectins L-SIGN and DC-SIGN Capture and Transmit Infectious Hepatitis C Virus Pseudotype Particles. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 32035–32045.
- Lozach, P. Y., Lortat-Jacob, H., De Lacroix De Lavalette, A., Staropoli, I., Fong, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O. & other authors. (2003).** DC-SIGN and L-SIGN Are High Affinity Binding Receptors for Hepatitis C Virus Glycoprotein E2. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 20358–20366.
- Luik, P., Chew, C., Aittoniemi, J., Chang, J., Wentworth, P., Dwek, R. A., Biggin, P. C., Vénien-Bryan, C. & Zitzmann, N. (2009).** The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *PNAS* **106**, 12712–12716.
- Lundin, M., Monne, M., Widell, A., Heijne, von, G. & Persson, M. A. A. (2003).** Topology of the Membrane-Associated Hepatitis C Virus Protein NS4B. *Journal of Virology* **77**, 5428–5438.
- Luo, G. (1999).** Cellular proteins bind to the poly(U) tract of the 3' untranslated region of hepatitis C virus RNA genome. *Virology* **256**, 105–118.
- Lupberger, J., Zeisel, M. B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C. J., Turek, M. & other authors. (2011).** EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* **17**, 589–595.
- Ma, Y., Yates, J., Liang, Y., Lemon, S. M. & Yi, M. (2008).** NS3 Helicase Domains Involved in Infectious Intracellular Hepatitis C Virus Particle Assembly. *Journal of Virology* **82**, 7624–7639.
- Ma, Y., Anantpadma, M., Timpe, J. M., Shanmugam, S., Singh, S. M., Lemon, S. M. & Yi, M. (2011).** Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *Journal of Virology* **85**, 86–97.
- Macdonald, A. & Harris, M. (2004).** Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J Gen Virol* **85**, 2485–2502.
- Mandiyan, V. V., Andreev, J. J., Schlessinger, J. J. & Hubbard, S. R. S. (1999).** Crystal structure of the ARF-GAP domain and ankyrin repeats of PYK2-associated protein beta. *EMBO J* **18**, 6890–6898.
- Manolea, F., Claude, A., Chun, J., Rosas, J. & Melançon, P. (2008).** Distinct functions for Arf guanine nucleotide exchange factors at the Golgi complex: GBF1 and BIGs are required for assembly and maintenance of the Golgi stack and trans-Golgi network, respectively. *Mol Biol Cell* **19**, 523–535.
- Martin, C., Nielsen, S. U., Ibrahim, S., Bassendine, M. F. & Toms, G. L. (2008).** Binding of liver derived, low density hepatitis C virus to human hepatoma cells. *J Med Virol* **80**, 816–823.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T. & other authors. (2008).** Interaction of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A with Core Protein Is Critical for the Production of

- Infectious Virus Particles. *Journal of Virology* **82**, 7964–7976.
- Matto, M., Sklan, E. H., David, N., Melamed-Book, N., Casanova, J. E., Glenn, J. S. & Aroeti, B. (2010).** Role for ADP ribosylation factor 1 in the regulation of hepatitis C virus replication. *Journal of Virology* **85**, 946–956.
- Maynell, L. A., Kirkegaard, K. & Klymkowsky, M. W. (1992).** Inhibition of poliovirus RNA synthesis by brefeldin A. *Journal of Virology* **66**, 1985–1994.
- McCaffrey, A. (2002).** Determinants of Hepatitis C Translational Initiation in Vitro, in Cultured Cells and Mice. *Molecular Therapy* **5**, 676–684.
- McLauchlan, J. (2000).** Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* **7**, 2–14. Wiley Online Library.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. & Martoglio, B. (2002).** Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* **21**, 3980–3988. Wiley Online Library.
- Meertens, L., Bertaux, C., Cukierman, L., Cormier, E., Lavillette, D., Cosset, F. L. & Dragic, T. (2008).** The Tight Junction Proteins Claudin-1, -6, and -9 Are Entry Cofactors for Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **82**, 3555–3560.
- Meertens, L., Bertaux, C. & Dragic, T. (2006).** Hepatitis C Virus Entry Requires a Critical Postinternalization Step and Delivery to Early Endosomes via Clathrin-Coated Vesicles. *Journal of Virology* **80**, 11571–11578.
- Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A. & other authors. (2001).** Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* **7**, 927–933.
- Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J., Lacas-Gervais, S., Drin, G. & Antonny, B. (2013).** A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell* **155**, 830–843.
- Meuleman, P., Catanese, M. T., Verhoye, L., Desombere, I., Farhoudi, A., Jones, C. T., Sheahan, T., Grzyb, K., Cortese, R. & other authors. (2012).** A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *Hepatology* **55**, 364–372.
- Meuleman, P., Libbrecht, L., De Vos, R., de Hemptinne, B., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Roskams, T. & Leroux-Roels, G. (2005).** Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology* **41**, 847–856.
- Meunier, J. C. J., Fournillier, A. A., Choukhi, A. A., Cahour, A. A., Cocquerel, L. L., Dubuisson, J. J. & Wychowski, C. C. (1999).** Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *J Gen Virol* **80** (Pt 4), 887–896.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. & Tschopp, J. (2005).** Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature Cell Biology* **437**, 1167–1172.
- Misumi, Y., Misumi, Y., Miki, K., Takatsuki, A., Tamura, G. & Ikehara, Y. (1986).** Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* **261**, 11398–11403.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. & Shimotohno, K. (2007).** The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology* **9**, 1089–1097.
- Miyanari, Y., Hijikata, M., Yamaji, M., Hosaka, M., Takahashi, H. & Shimotohno, K.**

- (2003). Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *J Biol Chem* **278**, 50301–50308.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Graber, P. & other authors. (2007).** The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *Journal of Hepatology* **46**, 411–419.
- Monetta, P., Slavin, I., Romero, N. & Alvarez, C. (2007).** Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Mol Biol Cell* **18**, 2400–2410.
- Montserret, R., Saint, N., Vanbelle, C., Salvay, A. G., Simorre, J.-P., Ebel, C., Sapay, N., Renisio, J.-G., Böckmann, A. & other authors. (2010).** NMR structure and ion channel activity of the p7 protein from hepatitis C virus. *J Biol Chem* **285**, 31446–31461.
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H. E., Bartenschlager, R., Penin, F. & Lohmann, V. (2004).** Membrane Association of the RNA-Dependent RNA Polymerase Is Essential for Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology* **78**, 13278–13284.
- Moradpour, D., Gosert, R., Egger, D., Penin, F., BLUM, H. & Bienz, K. (2003).** Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Research* **60**, 103–109.
- Morikawa, K., Zhao, Z., Date, T., Miyamoto, M., Murayama, A., Akazawa, D., Tanabe, J., Sone, S. & Wakita, T. (2007).** The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J Med Virol* **79**, 714–723.
- Nattermann, J. (2006).** Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* **55**, 869–877.
- Neumann, A. U. (1998).** Hepatitis C Viral Dynamics in Vivo and the Antiviral Efficacy of Interferon- Therapy. *Science* **282**, 103–107.
- Neumann-Haefelin, C., Blum, H. E., Chisari, F. V. & Thimme, R. (2005).** T cell response in hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Virology* **32**, 75–85.
- Nguyen, H., Sankaran, S. & Dandekar, S. (2006).** Hepatitis C virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes. *Virology* **354**, 58–68.
- Nielsen, S. U., Bassendine, M. F., Burt, A. D., Martin, C., Pumeechockchai, W. & Toms, G. L. (2006).** Association between Hepatitis C Virus and Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL)/LDL Analyzed in Iodixanol Density Gradients. *Journal of Virology* **80**, 2418–2428.
- Niepmann, M. (2009).** Activation of hepatitis c virus translation by a liver-specific microRNA. *Cell Cycle* **8**, 1473–1477.
- Nitta, S., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Kakinuma, S., Mishima, K., Kusano-Kitazume, A., Kiyohashi, K., Murakawa, M., Nishimura-Sakurai, Y. & other authors. (2013).** Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* **57**, 46–58.
- Niu, T.-K., Pfeifer, A. C., Lippincott-Schwartz, J. & Jackson, C. L. (2005).** Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol Biol Cell* **16**, 1213–1222.
- Okamoto, K., Mori, Y., Komoda, Y., Okamoto, T., Okochi, M., Takeda, M., Suzuki, T., Moriishi, K. & Matsuura, Y. (2008).** Intramembrane Processing by Signal Peptide Peptidase Regulates the Membrane Localization of Hepatitis C Virus Core Protein

- and Viral Propagation. *Journal of Virology* **82**, 8349–8361.
- Okamoto, T., Nishimura, Y., Ichimura, T., Suzuki, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Moriishi, K. & Matsuura, Y. (2006).** Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J* **25**, 5015–5025.
- Op De Beeck, A., Voisset, C., Bartosch, B., Ciczora, Y., Cocquerel, L., Keck, Z., Fong, S., Cosset, F. L. & Dubuisson, J. (2004).** Characterization of Functional Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. *Journal of Virology* **78**, 2994–3002.
- Orci, L., Palmer, D. J., Amherdt, M. & Rothman, J. E. (1993).** Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatamer and ARF proteins from the cytosol. *Nature* **364**, 732–734.
- Otto, G. A. & Puglisi, J. D. (2004).** The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* **119**, 369–380.
- Owen, D. M., Huang, H., Ye, J. & Gale, M., Jr. (2009).** Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* **394**, 99–108. Elsevier Inc.
- Palmer, D. J., Helms, J. B., Beckers, C. J., Orci, L. & Rothman, J. E. (1993).** Binding of coatamer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *J Biol Chem* **268**, 12083–12089.
- Pang, P. S., Jankowsky, E., Planet, P. J. & Pyle, A. M. (2002).** The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J* **21**, 1168–1176. EMBO Press.
- Park, C. Y., Jun, H. J., Wakita, T., Cheong, J. H. & Hwang, S. B. (2009).** Hepatitis C Virus Nonstructural 4B Protein Modulates Sterol Regulatory Element-binding Protein Signaling via the AKT Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 9237–9246.
- Pasqualato, S., Renault, L. & Cherfils, J. (2002).** Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for ‘front-back’ communication. *EMBO Rep* **3**, 1035–1041.
- Patient, R., Hourieux, C., Vaudin, P., Pagès, J.-C. & Roingeard, P. (2009).** Chimeric hepatitis B and C viruses envelope proteins can form subviral particles: implications for the design of new vaccine strategies. *New Biotechnology* **25**, 226–234.
- Pawlotsky, J.-M. (2014).** New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. *Gastroenterology* **146**, 1176–1192.
- Pepperkok, R., Whitney, J. A., Gomez, M. & Kreis, T. E. (2000).** COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *Journal of Cell Science* **113**, 135–144. The Company of Biologists Ltd.
- Peretti, D., Dahan, N., Shimoni, E., Hirschberg, K. & Lev, S. (2008).** Coordinated lipid transfer between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex requires the VAP proteins and is essential for Golgi-mediated transport. *Mol Biol Cell* **19**, 3871–3884.
- Pestka, J. M., Zeisel, M. B., Bläser, E., Schürmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Patel, A. H., Meisel, H., Baumert, J. & Viazov, S. (2007).** Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 6025–6030. National Acad Sciences.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J. & Hellen, C. U. T. (1998).** A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes & Development* **12**, 67–83.
- Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J. & Jackson, C. L. (1999).**

- Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* **3**, 275–285.
- Pflugheber, J., Fredericksen, B., Sumpter, R., Wang, C., Ware, F., Sodora, D. L. & Gale, M. (2002).** Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 4650–4655.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G., Kurpanek, K. & Bartenschlager, R. (2001).** Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *Journal of Virology* **75**, 1252–1264.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M. & other authors. (2006).** Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 7408–7413.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D. & Bartenschlager, R. (2002).** Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *Journal of Virology* **76**, 4008–4021.
- Pileri, P. (1998).** Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* **282**, 938–941.
- Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P. & Rice, C. M. (2009).** Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882–886. Nature Publishing Group.
- Ploss, A. & Rice, C. M. (2009).** Towards a small animal model for hepatitis C. *EMBO Rep* **10**, 1220–1227.
- Podevin, P., Carpentier, A., Pène, V., Aoudjehane, L., Carrière, M., Zaïdi, S., Hernandez, C., Calle, V., Méritet, J. F. & other authors. (2010).** BASIC—LIVER, PANCREAS, AND BILIARY TRACT. *Gastroenterology* **139**, 1355–1364.e6. Elsevier Inc.
- Poordad, F., McCone, J., Bacon, B. R., Bruno, S., Manns, M. P., Sulkowski, M. S., Jacobson, I. M., Reddy, K. R., Goodman, Z. D. & other authors. (2011).** Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* **364**, 1195–1206.
- Popescu, C.-I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Hélot, L. & other authors. (2011a).** NS2 Protein of Hepatitis C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly. *PLoS Pathog* **7**, e1001278 (C. M. Walker, Ed.).
- Popescu, C.-I., Rouillé, Y. & Dubuisson, J. (2011b).** Hepatitis C Virus Assembly Imaging. *Viruses* **3**, 2238–2254.
- Poynard, T., Yuen, M.-F., Ratziu, V. & Lai, C. L. (2003).** Viral hepatitis C. *Lancet* **362**, 2095–2100.
- Qin, W., Luo, H., Nomura, T., Hayashi, N., Yamashita, T. & Murakami, S. (2002).** Oligomeric Interaction of Hepatitis C Virus NS5B Is Critical for Catalytic Activity of RNA-dependent RNA Polymerase. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 2132–2137.
- Quinkert, D., Bartenschlager, R. & Lohmann, V. (2005).** Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *Journal of Virology* **79**, 13594–13605.
- Randall, G., Panis, M., Cooper, J. D., Tellinghuisen, T. L., Sukhodolets, K. E., Pfeffer, S., Landthaler, M., Landgraf, P., Kan, S. & other authors. (2007).** Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 12884–12889.
- Reesink, H. W., Zeuzem, S., Weegink, C. J., Forestier, N., van Vliet, A., van de Wetering de Rooij, J., McNair, L., Purdy, S., Kauffman, R. & other authors. (2006).** Rapid Decline of Viral RNA in Hepatitis C Patients Treated With VX-950: A Phase Ib, Placebo-Controlled, Randomized Study. *Gastroenterology* **131**, 997–1002.
- Reinhard, C., Schweikert, M., Wieland, F. T. & Nickel, W. (2003).** Functional

- reconstitution of COPI coat assembly and disassembly using chemically defined components. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 8253–8257.
- Renault, L., Guibert, B. & Cherfils, J. (2003).** Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* **426**, 525–530. Nature Publishing Group.
- Rhainds, D. & Brissette, L. (2003).** The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **36**, 39–77.
- Ritzenthaler, C., Laporte, C., Gaire, F., Dunoyer, P., Schmitt, C., Duval, S., Piequet, A., Loudes, A. M., Rohfritsch, O. & other authors. (2002).** Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *Journal of Virology* **76**, 8808–8819.
- Robineau, S., Chabre, M. & Antonny, B. (2000).** Binding site of brefeldin A at the interface between the small G protein ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) and the nucleotide-exchange factor Sec7 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 9913–9918. National Acad Sciences.
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S. & other authors. (2012).** Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLoS Pathog* **8**, e1003056 (G. G. Luo, Ed.).
- Roohvand, F., Maillard, P., Lavergne, J.-P., Boulant, S., Walic, M., Andréo, U., Goueslain, L., Helle, F., Mallet, A. & other authors. (2009).** Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein. *J Biol Chem* **284**, 13778–13791.
- Rouillé, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A. H. & other authors. (2006).** Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of Virology* **80**, 2832–2841.
- Roussel, J., Pillez, A., Montpellier, C., Duverlie, G., Cahour, A., Dubuisson, J. & Wychowski, C. (2003).** Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. *J Gen Virol* **84**, 1751–1759. Soc General Microbiol.
- Rubín, A., Aguilera, V. & Berenguer, M. (2011).** Liver transplantation and hepatitis C. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **35**, 805–812.
- Rumin, S., Berthillon, P., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Trabaud, M. A., Bizollon, T., Gouillat, C., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C. & other authors. (1999).** Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *J Gen Virol* **80** (Pt 11), 3007–3018.
- Sainz, B., Barretto, N., Martin, D. N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K. A., Yu, X., Chayama, K. & other authors. (2012).** Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* **18**, 281–285.
- Saitoh, A., Shin, H. W., Yamada, A., Waguri, S. & Nakayama, K. (2009).** Three Homologous ArfGAPs Participate in Coat Protein I-mediated Transport. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 13948–13957.
- Sakai, A., Claire, M. S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Bukh, J. (2003).** The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 11646–11651. National Acad Sciences.

- Santantonio, T., Wiegand, J. & Gerlach, J. T. (2008).** Acute hepatitis C: current status and remaining challenges. *Journal of Hepatology* **49**, 625–633.
- Satoh, S., Hirota, M., Noguchi, T., Hijikata, M., Handa, H. & Shimotohno, K. (2000).** Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* **270**, 476–487.
- Sáenz, J. B., Sun, W. J., Chang, J. W., Li, J., Bursulaya, B., Gray, N. S. & Haslam, D. B. (2009).** Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function. *Nat Chem Biol* **5**, 157–165.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. & Vitelli, A. (2002).** The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* **21**, 5017–5025. Wiley Online Library.
- Schaller, T., Appel, N., Koutsoudakis, G., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R. (2007).** Analysis of Hepatitis C Virus Superinfection Exclusion by Using Novel Fluorochrome Gene-Tagged Viral Genomes. *Journal of Virology* **81**, 4591–4603.
- Serebrov, V. & Pyle, A. M. (2004).** Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature* **430**, 476–480.
- Shi, S. T., Lee, K.-J., Aizaki, H., Hwang, S. B. & Lai, M. M. C. (2003).** Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *Journal of Virology* **77**, 4160–4168.
- Shinotsuka, C., Yoshida, Y., Kawamoto, K., Takatsu, H. & Nakayama, K. (2002).** Overexpression of an ADP-ribosylation Factor-Guanine Nucleotide Exchange Factor, BIG2, Uncouples Brefeldin A-induced Adaptor Protein-1 Coat Dissociation and Membrane Tubulation. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 9468–9473.
- Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K. & Murakami, S. (2002).** Hepatitis C Virus (HCV) NS5A Binds RNA-dependent RNA Polymerase (RdRP) NS5B and Modulates RNA-dependent RNA Polymerase Activity. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 11149–11155.
- Song, Y. Y., Friebe, P. P., Tzima, E. E., Jünemann, C. C., Bartenschlager, R. R. & Niepmann, M. M. (2006).** The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *Journal of Virology* **80**, 11579–11588.
- Su, A. I., Pezacki, J. P., Wodicka, L., Brideau, A. D., Supekova, L., Thimme, R., Wieland, S., Bukh, J., Purcell, R. H. & other authors. (2002).** Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 15669–15674.
- Sumpter, R., Loo, Y. M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M. & Gale, M. (2005).** Regulating Intracellular Antiviral Defense and Permissiveness to Hepatitis C Virus RNA Replication through a Cellular RNA Helicase, RIG-I. *Journal of Virology* **79**, 2689–2699.
- Tai, A. W., Benita, Y., Peng, L. F., Kim, S.-S., Sakamoto, N., Xavier, R. J. & Chung, R. T. (2009).** A Functional Genomic Screen Identifies Cellular Cofactors of Hepatitis C Virus Replication. *Cell Host & Microbe* **5**, 298–307.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K. & Shimotohno, K. (1996).** Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *Journal of Virology* **70**, 3307–3312.
- Tanigawa, G., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Helms, J. B. & Rothman, J. E. (1993).** Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol* **123**, 1365–1371. Rockefeller Univ Press.

- Targett-Adams, P., Boulant, S. & McLauchlan, J. (2008).** Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology* **82**, 2182–2195.
- Tasaka, M., Sakamoto, N., Itakura, Y., Nakagawa, M., Itsui, Y., Sekine-Osajima, Y., Nishimura-Sakurai, Y., Chen, C.-H., Yoneyama, M. & other authors. (2007).** Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol* **88**, 3323–3333.
- Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L., Treadaway, J. C. & Rice, C. M. (2008a).** Identification of Residues Required for RNA Replication in Domains II and III of the Hepatitis C Virus NS5A Protein. *Journal of Virology* **82**, 1073–1083.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A. E. & Rice, C. M. (2004).** The NS5A Protein of Hepatitis C Virus Is a Zinc Metalloprotein. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 48576–48587.
- Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L. & Treadaway, J. (2008b).** Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* **4**, e1000032. Public Library of Science.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. (2005).** Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature Cell Biology* **435**, 374–379.
- Thompson, A. A., Zou, A., Yan, J., Duggal, R., Hao, W., Molina, D., Cronin, C. N. & Wells, P. A. (2009).** Biochemical Characterization of Recombinant Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B: Evidence for ATP/GTP Hydrolysis and Adenylate Kinase Activity †. *Biochemistry* **48**, 906–916.
- Trotard, M., Lepere-Douard, C., Regeard, M., Piquet-Pellorce, C., Lavillette, D., Cosset, F. L., Gripon, P. & Le Seyec, J. (2009).** Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening. *The FASEB Journal* **23**, 3780–3789.
- Tsai, S. L., Liaw, Y., Chen, M., Huang, C. T. & Kuo, G. C. (1997).** Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: Implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* **25**, 449–458. Wiley Online Library.
- Tscherne, D. M., Evans, M. J., Hahn, von, T., Jones, C. T., Stamataki, Z., McKeating, J. A., Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2007).** Superinfection Exclusion in Cells Infected with Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **81**, 3693–3703.
- Tscherne, D. M., Jones, C. T., Evans, M. J., Lindenbach, B. D., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2006).** Time- and Temperature-Dependent Activation of Hepatitis C Virus for Low-pH-Triggered Entry. *Journal of Virology* **80**, 1734–1741.
- Tseng, C.-T. K. & Klimpel, G. R. (2002).** Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* **195**, 43–49.
- Tsukita, S., Furuse, M. & Itoh, M. (2001).** Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 285–293.
- Vaillancourt, F. H., Pilote, L., Cartier, M., Lippens, J., Liuzzi, M., Bethell, R. C., Cordingley, M. G. & Kukolj, G. (2009).** Identification of a lipid kinase as a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* **387**, 5–10.
- van der Schaar, H. M., van der Linden, L., Lanke, K. H. W., Strating, J. R. P. M., Pürstinger, G., de Vries, E., de Haan, C. A. M., Neyts, J. & van Kuppeveld, F. J. M. (2012).** Coxsackievirus mutants that can bypass host factor PI4KIII. *Nature Publishing Group* **22**, 1576–1592. Nature Publishing Group.
- Vanwolleghe, T., Libbrecht, L., Hansen, B. E., Desombere, I., Roskams, T., Meuleman, P. & Leroux-Roels, G. (2010).** Factors determining successful

- engraftment of hepatocytes and susceptibility to hepatitis B and C virus infection in uPA-SCID mice. *Journal of Hepatology* **53**, 468–476. European Association for the Study of the Liver.
- Vassilaki, N. (2003).** Two Alternative Translation Mechanisms Are Responsible for the Expression of the HCV ARFP/F/Core+1 Coding Open Reading Frame. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 40503–40513.
- Verdegem, D., Badillo, A., Wieruszeski, J. M., Landrieu, I., Leroy, A., Bartenschlager, R., Penin, F., Lippens, G. & Hanouille, X. (2011).** Domain 3 of NS5A Protein from the Hepatitis C Virus Has Intrinsic α -Helical Propensity and Is a Substrate of Cyclophilin A. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 20441–20454.
- Verheije, M. H., Raaben, M., Mari, M., Lintel, E. G., Reggiori, F., van Kuppeveld, F. J. M., Rottier, P. J. M. & de Haan, C. A. M. (2008).** Mouse Hepatitis Coronavirus RNA Replication Depends on GBF1-Mediated ARF1 Activation. *PLoS Pathog* **4**, e1000088 (R. S. Baric, Ed.).
- Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A. H. & Dubuisson, J. (2010).** Characterization of the Envelope Glycoproteins Associated with Infectious Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **84**, 10159–10168.
- Vieyres, G., Brohm, C., Friesland, M., Gentzsch, J., Wölk, B., Roingeard, P., Steinmann, E. & Pietschmann, T. (2013).** Subcellular localization and function of an epitope-tagged p7 viroporin in hepatitis C virus-producing cells. *Journal of Virology* **87**, 1664–1678.
- Volpicelli-Daley, L. A., Li, Y., Zhang, C.-J. & Kahn, R. A. (2005).** Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic. *Mol Biol Cell* **16**, 4495–4508.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G. & other authors. (2005).** Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**, 791–796.
- Wang, C., Sarnow, P. & Siddiqui, A. (1993).** Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *Journal of Virology* **67**, 3338–3344.
- Wang, C., Gale, M., Keller, B. C., Huang, H., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Ye, J. (2005).** Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol Cell* **18**, 425–434.
- Wang, H., Perry, J. W., Lauring, A. S., Neddermann, P., De Francesco, R. & Tai, A. W. (2014a).** Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. *Gastroenterology* **146**, 1373–85.e1–11.
- Wang, J., Du, J. & Jin, Q. (2014b).** Class I ADP-ribosylation factors are involved in enterovirus 71 replication. *PLoS ONE* **9**, e99768.
- Washburn, M. L., Bility, M. T., Zhang, L., Kovalev, G. I., Buntzman, A., Frelinger, J. A., Barry, W., Ploss, A., Rice, C. M. & Su, L. (2011).** A Humanized Mouse Model to Study Hepatitis C Virus Infection, Immune Response, and Liver Disease. *Gastroenterology* **140**, 1334–1344.
- Waxman, L., Whitney, M., Pollok, B. A., Kuo, L. C. & Darke, P. L. (2001).** Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 13931–13935.
- Welbourn, S., Green, R., Gamache, I., Dandache, S., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Meerovitch, K. & Pause, A. (2005).** Hepatitis C virus NS2/3 processing is required

- for NS3 stability and viral RNA replication. *J Biol Chem* **280**, 29604–29611.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L. & Der, C. J. (2005).** The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* **118**, 843–846.
- Wölk, B., Sansonno, D., Kräusslich, H.-G., Dammacco, F., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2000).** Subcellular Localization, Stability, and trans-Cleavage Competence of the Hepatitis C Virus NS3-NS4A Complex Expressed in Tetracycline-Regulated Cell Lines. *Journal of Virology* **74**, 2293–2304. Am Soc Microbiol.
- Xu, Z., Choi, J., Yen, T. S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M. J. & Ou, J. H. (2001).** Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* **20**, 3840–3848. Wiley Online Library.
- Yang, J.-S., Gad, H., Lee, S. Y., Mironov, A., Zhang, L., Beznoussenko, G. V., Valente, C., Turacchio, G., Bonsra, A. N. & other authors. (2008).** A role for phosphatidic acid in COPI vesicle fission yields insights into Golgi maintenance. *Nature Cell Biology* **10**, 1146–1153.
- Yang, J.-S., Lee, S. Y., Spanò, S., Gad, H., Zhang, L., Nie, Z., Bonazzi, M., Corda, D., Luini, A. & Hsu, V. W. (2005).** A role for BARS at the fission step of COPI vesicle formation from Golgi membrane. *EMBO J* **24**, 4133–4143.
- Yi, M. & Lemon, S. M. (2003).** 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology* **77**, 3557–3568.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J. & Lemon, S. M. (2009).** trans-Complementation of an NS2 Defect in a Late Step in Hepatitis C Virus (HCV) Particle Assembly and Maturation. *PLoS Pathog* **5**, e1000403 (K. Kirkegaard, Ed.).
- Yi, M., Villanueva, R. A., Thomas, D. L., Wakita, T. & Lemon, S. M. (2006).** Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 2310–2315.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J. & Lemon, S. M. (2007).** Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. *Journal of Virology* **81**, 629–638.
- Yoon, J. C., Shiina, M., Ahlenstiel, G. & Rehmann, B. (2008).** Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology* **49**, 12–21.
- You, S. & Rice, C. M. (2008).** 3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U). *Journal of Virology* **82**, 184–195.
- Yu, G. Y., Lee, K. J., Gao, L. & Lai, M. M. C. (2006).** Palmitoylation and Polymerization of Hepatitis C Virus NS4B Protein. *Journal of Virology* **80**, 6013–6023.
- Zeeh, J.-C., Zeghouf, M., Grauffel, C., Guibert, B., Martin, E., Dejaegere, A. & Cherfils, J. (2006).** Dual specificity of the interfacial inhibitor brefeldin A for arf proteins and sec7 domains. *J Biol Chem* **281**, 11805–11814.
- Zeisel, M. B., Koutsoudakis, G., Schnober, E. K., Haberstroh, A., Blum, H. E., Cosset, F.-L., Wakita, T., Jaeck, D., Doffoël, M. & other authors. (2007).** Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* **46**, 1722–1731.
- Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2004).** CD81 Is Required for Hepatitis C Virus Glycoprotein-Mediated Viral Infection. *Journal of Virology* **78**, 1448–1455.
- Zhang, J., Yamada, O., Yoshida, H., Iwai, T. & Araki, H. (2002).** Autogenous Translational Inhibition of Core Protein: Implication for Switch from Translation to RNA Replication in Hepatitis C Virus. *Virology* **293**, 141–150.
- Zhang, L., Hong, Z., Lin, W., Shao, R.-X., Goto, K., Hsu, V. W. & Chung, R. T. (2012).**

- ARF1 and GBF1 generate a PI4P-enriched environment supportive of hepatitis C virus replication. *PLoS ONE* **7**, e32135.
- Zhang, P., Wu, C. G., Mihalik, K., Virata-Theimer, M. L., Yu, M.-Y. W., Alter, H. J. & Feinstone, S. M. (2007a).** Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 8449–8454.
- Zhang, Q., Major, M. B., Takanashi, S., Camp, N. D., Nishiya, N., Peters, E. C., Ginsberg, M. H., Jian, X., Randazzo, P. A. & other authors. (2007b).** Small-molecule synergist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 7444–7448.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T. & Chisari, F. V. (2005).** Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 9294–9299.
- Zona, L., Lupberger, J., Sidahmed-Adrar, N., Thumann, C., Harris, H. J., Barnes, A., Florentin, J., Tawar, R. G., Xiao, F. & other authors. (2013).** HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host & Microbe* **13**, 302–313.

suite à une infection par HCV. La prévalence de l'hépatite C en France était de 1,3% en 2010, ce pourcentage est en baisse depuis suite à l'introduction des nouveaux traitements (figure 1) (Lavanchy, 2011).

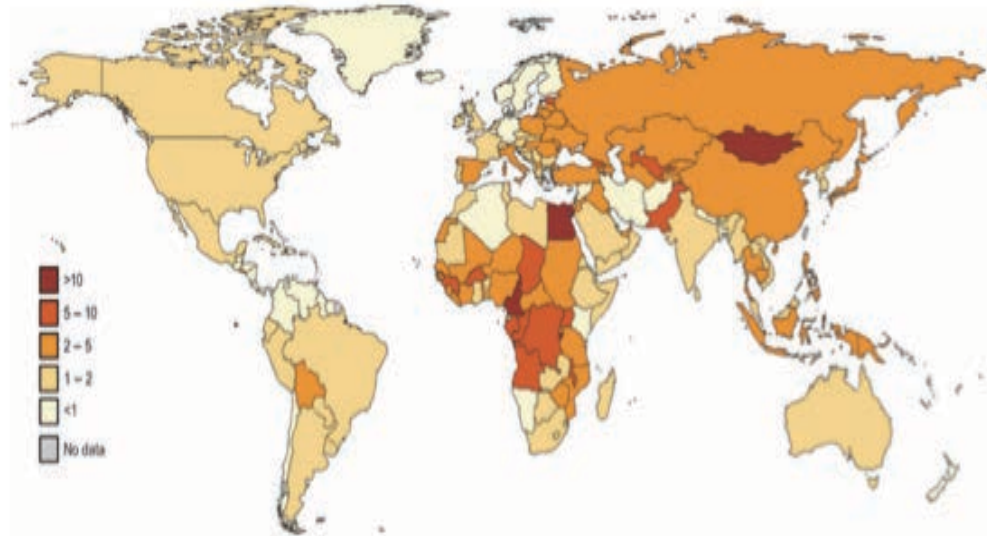


Figure 1 : Epidémiologie de HCV et sa répartition sur la surface du globe (Lavanchy, 2009).

3) Modes de transmission

HCV se transmet essentiellement par voie parentérale via 3 méthodes de contamination : contamination post-transfusionnelle, toxicomanie intraveineuse et contamination nosocomiale.

a) Contamination post-transfusionnelle

Les transfusions sanguines accompagnées d'hépatites ont participé à la découverte de HCV. Depuis les années 1990, des tests additifs ont été mis en place pour pouvoir détecter d'éventuelles contaminations du sang par HCV. Ces techniques ne sont encore pas assez appliquées dans les pays en voie de développement causant encore des cas de contamination par HCV suite à des transfusions sanguines.

de lecture au niveau de la séquence codant la protéine de capside, pourrait aboutir à la formation d'une protéine additionnelle dénommée protéine F ou ARFP.

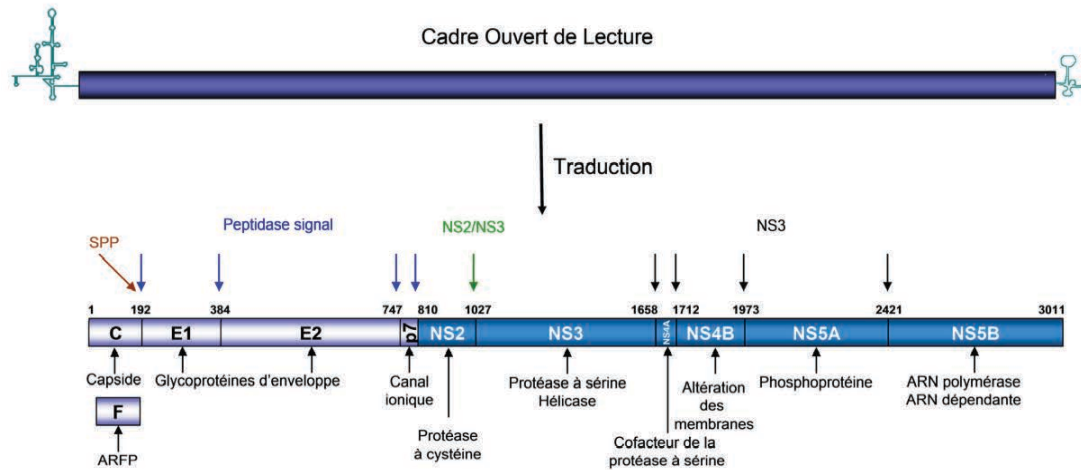


Figure 5 : Organisation du génome de HCV

L'ARN génomique est constitué d'un cadre de lecture ouvert (en violet foncé) encadré de deux régions non codantes (en turquoise). Ce cadre est traduit en une polyprotéine unique qui est clivée par la peptidase de signal peptide (SPP) (flèche marron), des signal-peptidases cellulaires (flèches bleues) et les protéases virales (NS2/3 (flèche verte) et NS3/4A (flèches noires)). Les protéines structurales sont représentées en violet clair et les protéines non-structurales en bleu. Les sites de clivage indiqués correspondent à ceux de la souche H77 (génotype 1a ; numéro d'accès AF009606). Adapté de (Lindenbach & Rice, 2005)

a) Les régions non-codantes du génome de HCV

i) La région 5' non-codante (5' NC)

La région 5' non-codante composée de 341 nucléotides est hautement conservée entre les génotypes viraux de HCV. Elle est composée de 4 domaines (I à IV). Les 115 premiers nucléotides forment les domaines I et II. Des signaux cruciaux pour la réplication virale sont présents dans ces 2 domaines, mais leur action nécessite la présence de l'intégralité de la région 5' NC pendant la réplication (Kim *et al.*, 2002),(Friebe *et al.*, 2001). Un site interne d'entrée des ribosomes (IRES) commence dans le domaine II et se termine dans la séquence codante. Le

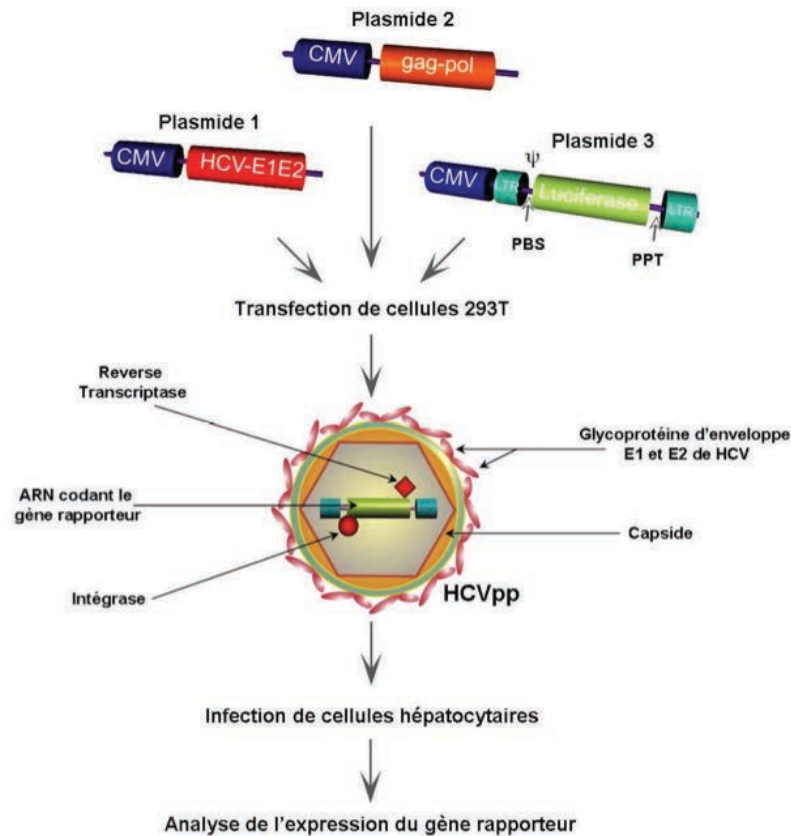


Figure 7 : Représentation schématique de la production des HCVpp. Les cellules HEK-293T sont transfectées avec trois vecteurs d'expression. Le premier code les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 de HCV. Le second exprime les protéines codées par les gènes gag et pol du MLV ou du VIH (Matrice, Capside, Nucléocapside, Protéase, Réverse-transcriptase et Intégrase). Le troisième exprime un génome rétroviral contenant un gène rapporteur (luciférase). Le génome rétroviral contient les séquences nécessaires à la réverse transcription et à l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN génomique de la cellule infectée (LTR, PBS, PPT). Les protéines de matrice, capside et nucléocapside permettent son encapsidation (grâce au signal d'encapsidation Ψ), l'assemblage de la particule et son bourgeonnement à la membrane plasmique. Les particules rétrovirales HCVpp, portant à leur surface les glycoprotéines E1 et E2, sont sécrétées dans le surnageant de culture. Elles sont utilisées pour infecter des cellules hépatocytaires. Les cellules infectées intègrent le gène rapporteur dans leur ADN génomique grâce aux reverse-transcriptase et intégrase. L'expression de ce gène rapporteur permet de quantifier l'infectedité des HCVpp. Tiré de (Voisset & Dubuisson, 2004)

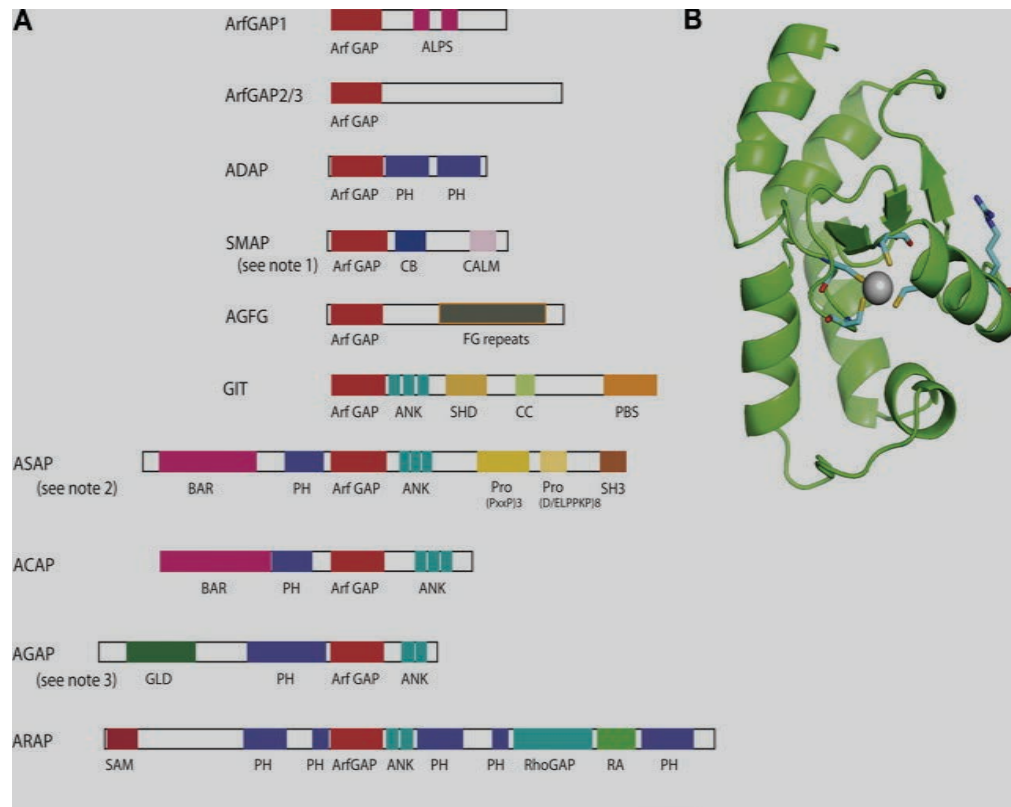


Figure 20 : Les protéines activatrices de l'activité GTPase des protéines ARF.

Un membre de chaque famille est représenté. Les domaines caractéristiques identifiés sont annotés.

A) ALPS, ArfGAP1 lipid-packing sensor; ArfGAP, ArfGAP domain; ANK, ankyrin repeat; BAR, Bin/Amphiphysin/Rvs; CALM, CALM binding domain; CB, clathrin-box; CC, coiled-coil; FG repeats, multiple copies of the XXFG motif; GLD, GTP-binding protein-like domain; PBS, Paxillin binding site; PH, pleckstrin homology domain; Pro(PxxP)3, cluster of three Proline-rich (PxxP) motifs; Pro(D/ELPPKP)8, eight tandem Proline-rich (D/ELPPKP) motifs; RA, Ras association motif; RhoGAP, RhoGAP domain; SAM, sterile α -motif; SH3, Src homology 3 domain; SHD, Spa-homology domain. (B) la structure d'un domaine isolé de ArfGAP1 (résidus 6-120) est schématisée dans cette figure montrant le squelette de la protéine. Les structures secondaires sont indiquées. Les résidus conservés (Arg50) ainsi que les 4 cystéines en doigts de Zn (Cys22, 25, 42, and 45) (Kahn et al., 2008)

c) Inhibition de la régulation des Arf

La compréhension des mécanismes successifs qui se déroulent pendant les étapes du transport vésiculaire a nécessité l'utilisation de plusieurs inhibiteurs chimiques qui bloquent chacun la voie à une étape donnée.